

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/090397 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/40**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002748
- (22) Internationales Anmeldedatum:
15. März 2005 (15.03.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 013 826.5 16. März 2004 (16.03.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Hansastrasse 27c, 80686 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LOTZ, Henrike** [DE/DE]; Hegelstrasse 28, 70174 Stuttgart (DE). **BRUNNER, Herwig** [DE/DE]; An der Betteleiche 6, 70569 Stuttgart (DE). **RUPP, Steffen** [DE/DE]; Oberer Bauernwaldweg 52, 70195 Stuttgart (DE).
- (74) Anwälte: **SCHRELL, Andreas** usw.; Gleiss, Grosse, Schrell & Partner, Leitzstrasse 46, 70469 Stuttgart (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: HYPHA-SPECIFIC CELL WALL PROTEINS OF *CANDIDA*

(54) Bezeichnung: HYPHENSPEZIFISCHE ZELLWANDPROTEINE VON CANDIDA

(57) Abstract: The invention relates to: nucleic acids that code a cell wall protein required for the hyphal development of *Candida*; fragments of the nucleic acids; vectors containing the nucleic acids or nucleic acid fragments; host cells containing the vectors; cell wall proteins coded by the nucleic acids; antibodies directed against the proteins; methods for producing the cell wall proteins; methods for characterizing and/or for detecting the hyphal stage of *Candida*; methods for detecting a *Candida* infection; methods for identifying substances having a therapeutic effect against diseases caused by *Candida*; diagnostic and pharmaceutical compositions containing the nucleic acids, nucleic acid fragments, vectors, host cells, proteins and/or antibodies directed against the cell wall protein; kits for conducting in-vitro indentation of the cell wall proteins, and; to the use of the nucleic acids, vectors, proteins or antibodies for diagnosing and treating *Candida*-caused diseases i.e. producing diagnostic or pharmaceutical compositions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuren, die ein zur Hyphenentwicklung von *Candida* erforderliches Zellwandprotein codieren, Fragmente der Nucleinsäuren, die Nucleinsäuren oder Nucleinsäure-Fragmente enthaltende Vektoren, die Vektoren enthaltende Wirtszellen, die von den Nucleinsäuren codierten Zellwandproteine, gegen die Proteine gerichtete Antikörper, Verfahren zur Herstellung der Zellwandproteine, Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des Hyphenstadiums von *Candida*, Verfahren zum Nachweis einer *Candida*-Infektion, Verfahren zum Identifizieren von Substanzen mit therapeutischer Wirkung gegen durch *Candida* verursachte Krankheiten, diagnostische und pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Nucleinsäuren, Nucleinsäure-Fragmente, Vektoren, Wirtszellen, Proteine und/oder Antikörper gegen das Zellwandprotein enthalten, Kits zur in vitro-Identifizierung der Zellwandproteine sowie die Verwendung der Nucleinsäuren, Vektoren, Proteine oder Antikörper zur Diagnose und Behandlung von *Candida* verursachten Krankheiten beziehungsweise zur Herstellung von diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen.

WO 2005/090397 A1

Hyphenspezifische Zellwandproteine von CandidaBeschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuren, die ein zur Hyphenentwicklung von *Candida* erforderliches Zellwandprotein codieren, Fragmente der Nucleinsäuren, die Nucleinsäuren oder Nucleinsäure-
5 Fragmente enthaltende Vektoren, die Vektoren enthaltende Wirtszellen, die von den Nucleinsäuren codierten Zellwandproteine, gegen die Proteine gerichtete Antikörper, Verfahren zur Herstellung der Zellwandproteine, Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des Hyphenstadiums von *Candida*, Verfahren zum Nach-
10 weis einer *Candida*-Infektion, Verfahren zum Identifizieren von Substanzen mit therapeutischer Wirkung gegen durch *Candida* verursachte Krankheiten, diagnostische und pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Nucleinsäuren, Nucleinsäure-Fragmente, Vektoren, Wirtszellen, Proteine und/oder Antikörper gegen das Zell-
15 wandprotein enthalten, Kits zur in vitro-Identifizierung der Zellwandproteine sowie die Verwendung der Nucleinsäuren, Vektoren, Proteine oder Antikörper zur Diagnose und Behandlung von *Candida*-verursachten Krankheiten beziehungsweise zur Herstellung von diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen.

20 *Candida albicans* ist der häufigste Erreger von systemischen Mykosen beim Menschen. Normalerweise besiedelt *C. albicans* als Kommensale die Oberflächen des Gastrointestinal-Traktes und der Schleimhäute von Mensch und Tier. Während einer systemischen Infektion kann *C. albicans* jedoch eine Vielzahl wichtiger Organe eines Organismus befallen. Bei immunsupprimierten Patienten kann *C. albicans* häufig opportunistische Infektionen verursachen. Insbesondere bei immunsupprimierten Patienten können *Candida*-
25

Infektionen einen äußerst schweren Verlauf nehmen und zu lebensbedrohenden Zuständen führen. Die Inzidenz invasiver und schwer zu behandelnder *Candida*-Mykosen nimmt weltweit deutlich zu. Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von Pilzinfektionen wie *Candida*-Mykosen gehören Neutropenie, aggressive Tumortherapie, Immunsuppression, AIDS, Antibiotika-Therapien, Diabetes mellitus, eine sehr lange Verweildauer intravenöser Katheder, Graft-versus-Host-Krankheit und chirurgische Eingriffe.

5 Die exakte Diagnose pilzlicher Infektionen, insbesondere von *Candida*-Infektionen, ist äußerst schwierig, da die klinischen Befunde bei Pilzinfektionen überwiegend uncharakteristisch sind. Zur Diagnostik invasiver Pilzinfektionen werden bisher hauptsächlich Kulturen zur exakten Spezies-Bestimmung angelegt, wobei jedoch auf Kulturen basierende diagnostische Tests im Allgemeinen nicht ausreichend

10 genau und sensitiv sind. Darüber hinaus ist es auch sehr schwer, eine Unterscheidung zwischen einer Kolonisierung und einer Invasion des Pilz-Pathogenes vorzunehmen. Zur Diagnose von Pilzinfektionen werden auch Proben des Patienten mikroskopisch untersucht. Vor allem bei Vorliegen von nur wenigen Hyphenfragmenten ist allerdings eine Spezies-Unterscheidung und daher auch eine genaue Spezies-Bestimmung nicht immer möglich. Zum Nachweis invasiver Pilzinfektionen, insbesondere *Candida*-Infektionen, werden auch serologische Verfahren eingesetzt, wobei sich jedoch hier herausgestellt hat, dass die derzeit verfügbaren Antikörper-Tests bei immun-

15 supprimierten Patienten teilweise nur abgeschwächt reagieren, was eine Interpretation der Titer-Kinetik erschwert. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus Verfahren zum Nachweis von Pilzspezifischer DNA mit Hilfe von Hybridisierungsverfahren und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entwickelt, die jedoch in der klini-

schen Anwendung eine zu geringe Sensitivität und Spezifität zeigen. Problematisch ist insbesondere, dass die derzeit eingesetzten DNA-Extraktions- und Amplifikationsverfahren kein Routine-Screening von Patienten erlauben. Insgesamt zeigt sich, dass derzeit eine zuverlässige Diagnose von *Candida*-Infektionen sehr schwer ist, da die Diagnose-Verfahren nicht ausreichend sensitiv oder spezifisch sind, wobei invasive Pilz-Infektionen zumeist erst relativ spät erfasst werden können.

Die klinische Behandlung von *C. albicans*-Infektionen erfolgt derzeit hauptsächlich unter Verwendung von Polyen-Antibiotika, Azol-Derivaten, Allylaminen/Thiocarbamaten, Fluoropyrimidinen sowie Echinocandinen. Die derzeit verwendeten Antimykotika tragen den medizinischen Erfordernissen jedoch nur teilweise Rechnung.azole, beispielsweise Ketoconazol, sind hochtoxisch und weisen eine Reihe unerwünschte Nebenwirkungen auf. Auch hat sich gezeigt, dass sich in zunehmendem Maße gegen die eingesetzten Azole und Echinocandine Resistenzen entwickeln (Schuetzer-Muehlbauer et al., Mol. Microbiol., 48 (2003), 223-235). Polyen-Makrolide wie Amphotericin B und Nystatin führen aufgrund ihrer hohen Toxizität ebenfalls zu starken Nebenwirkungen.

Die Entwicklung weiterer verbesserter Diagnostika, die eine zuverlässige Zuordnung einer Erkrankung zu den durch die Gattung *Candida* hervorgerufenen Infektionen gestatten, und weiterer verbesserter Antimykotika zur Behandlung von Infektionen oder Krankheiten die durch *Candida* hervorgerufen werden, ist daher dringend erforderlich.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht daher in der Bereitstellung von Mitteln und Verfahren, die eine exakte und schnelle Diagnose der von *Candida*, insbesondere *C. albicans* hervorgerufenen Krankheiten und Infektionen ermöglichen, sowie in der Bereitstellung von Mitteln und Verfahren, die zur Entwicklung neuartiger hochwirksamer Therapeutika eingesetzt werden können, die insbesondere eine gezielte Therapie von durch *Candida* hervorgerufenen Infektionen ermöglichen und die nicht die im Stand der Technik bekannten Nachteile aufweisen, beispielsweise keine Nebenwirkungen im behandelten Organismus hervorrufen.

Die Erfindung löst das ihr zugrundeliegende technische Problem durch die Bereitstellung eines Nucleinsäuremoleküls, das ein zur Hyphenentwicklung eines pathogenen pilzlichen Organismus erforderliches Zellwandprotein codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einem Nucleinsäuremolekül mit einer der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleotidsequenzen,
- b) einem Nucleinsäuremolekül mit einer Nucleotidsequenz, die ein Protein mit einer der in SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4 oder SEQ ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codiert,
- c) einem Nucleinsäuremolekül mit einer Nucleotidsequenz, die über ihre gesamte Länge eine Homologie von mindestens 80 % zu einer Nucleotidsequenz eines der Nucleinsäuremoleküle von a) oder b) zeigt, und

- d) einem Nucleinsäuremolekül mit einer Nucleotidsequenz, die zu einer Nucleotidsequenz eines der Nucleinsäuremoleküle von a) bis c) komplementär ist.

Die vorliegende Erfindung löst also das ihr zugrundeliegende technische Problem durch die Bereitstellung von Nucleinsäuren, die hyphenspezifische Zellwandproteine von *Candida* codiert. Die erfindungsgemäß erstmals bereitgestellten hyphenspezifischen Zellwandproteine Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p sind pH- und/oder Temperatur-regulierte Virulenzfaktoren von *C. albicans*. Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p sind notwendig für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes durch *Candida*. Dies wurde durch die Erfinder der vorliegenden Erfindung insbesondere am Beispiel von Rbr1p in einem Maus-Modell für systemische Candidose nachgewiesen. Untersuchungen der Erfinder der Erfindung zeigen, dass Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p in Abhängigkeit vom pH-Wert in der Zelle exprimiert werden. Insbesondere für Rbr1p wurde gezeigt, dass es sich um ein GPI-verankertes Zellwandprotein handelt. Die hyphenspezifischen Zellwandproteine Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p sind als Bestandteile der Zellwand besonders gut für die Entwicklung von Antimykotika geeignet, da Zellwandproteine insbesondere für kleine Wirkstoff-Moleküle frei zugänglich sind, wobei diese keine Zellmembran überwinden müssen. Durch die Identifizierung von Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p als essentielle Faktoren für eine systemische *Candida*-Infektion werden neue, bislang noch nicht beschriebene Targets bereitgestellt, die sich in besonderem Maße zur Antimykotika-Entwicklung eignen.

Da die Zellwand von *Candida* für die Adhäsion von *Candida*-Zellen an Zellen des Wirtsorganismus verantwortlich ist, sind die Bestandteile der Zellwand hyphaler Zellen, also auch Rbr1p, Rbr2p und

Rbr3p, von besonderer Bedeutung für die Ausprägung der Pathogenität von *C. albicans*. Da die erfindungsgemäßen Proteine Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p nur in der Zellwand der virulenten Hyphenform vorkommen, lassen sich diese Zellwandproteine erfindungsgemäß 5 auch als serodiagnostische Marker einsetzen, um beispielsweise eine invasive *Candida*-Mykose von einer einfachen *Candida*-Kolonisierung zu unterscheiden, wobei durch den Nachweis des erfindungsgemäßen Rbr1p-, Rbr2p- und/oder Rbr3p-Proteins in einer zu untersuchenden Probe das Vorliegen einer *Candida*-Infektion angezeigt wird.
10

Erfindungsgemäß lassen sich die Rbr1p-, Rbr2p- und Rbr3p-Proteine in vorteilhafter Weise auch zur Entwicklung diagnostischer und/oder therapeutischer Antikörper einsetzen, mit deren Hilfe eine Spezies-spezifische Diagnose oder Therapie möglich ist. Alle Bestandteile der Zellwand von *Candida*-Zellen spielen eine essentielle Rolle bei der Auslösung und Modulation der gegen *Candida* gerichteten Immunreaktionen des Wirtsorganismus. Im Allgemeinen besteht die *Candida*-Zellwand aus komplexen Glucose-Polymeren, beispielsweise β -1,3-Glucanen und β -1,6-Glucanen, Chitin und Mannoproteinen. Gegen diese Antigene gerichtete Antikörper weisen daher stets auch diese Kohlenhydrat-Reste nach. Da die Mannane der einzelnen *Candida*-Spezies allerdings hohe Ähnlichkeit aufweisen, besteht zwischen den *Candida*-Spezies Kreuzreaktivität, sodass eine Unterscheidung einzelner *Candida*-Spezies unter Verwendung 15 von Antikörpern, die gegen Glucose-Polymeren gerichtet sind, häufig nicht möglich ist. Gegen die erfindungsgemäßen Zellwandproteine Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichtete Antikörper weisen jedoch nur Protein-spezifische Epitope nach, nicht jedoch unspezifische Mannan-Bestandteile.
20
25

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung umfasst der Begriff „*Candida*“ Sprosspilze der *Fungi imperfecti*. Sprosspilze von *Candida* sind pleomorphe Organismen, deren Lebenszyklus durch reversible morphogenetische Übergänge zwischen Sprossung und pseudohyphalen beziehungsweise hyphalen Wachstumsformen gekennzeichnet sind. Der Übergang von getrennten Hefezellen (Blastosporen) zu filamentösen Formen, das heißt Hyphen und Pseudohyphen, wird als Dimorphismus bezeichnet. Gene beziehungsweise die von diesen Genen codierten Proteine, die während des hyphalen Wachstums exprimiert werden, sind von enormer Bedeutung für die Ausprägung der Virulenzeigenschaften von *Candida*. Der Übergang zwischen filamentösem Wachstum und Virulenzeigenschaften kommt beispielsweise dadurch zum Ausdruck, dass *C. albicans*-Formen, die keine Hyphen ausbilden, in tierischem Modellsystem, beispielsweise *Mus musculus*, avirulent sind (Lo et al., Cell, 90 (1997), 939-949). Zu diesen fakultativ pathogenen Pilzen gehören neben *C. albicans* auch *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *Trichosporon*-Arten oder *Blastoschizomyces*-Arten.

Unter „Differenzierungsstadien“ oder „Wachstumsstadien“ von *Candida*-Zellen werden erfindungsgemäß die im *Candida*-Lebenszyklus auftretenden morphogenetischen Wachstumsformen verstanden, wobei insbesondere zwischen dem Hefe-Wachstumsstadium und dem Hyphen- und Pseudohyphen-Wachstumsstadium unterschieden wird. Der Übergang vom Hefewachstum zum filamentösen Wachstum, das heißt Bildung von Hyphen oder Pseudohyphen, wird als Dimorphismus bezeichnet. Das nicht-virulente Hefe-Stadium ist durch das Auftreten sogenannter Blastosporen, bei denen es sich um gram-positive kapsellose Sprosszellen von ovaler bis rundlicher

Form handelt, und die Vermehrung mittels Sprossung gekennzeichnet. Das virulente Hyphen- und Pseudohyphen-Wachstumsstadium ist durch die Bildung von echtem Myzel und/oder Pseudomyzel gekennzeichnet. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein während des Hyphenwachstums exprimierte Zellwandprotein codieren, ist es also möglich, das Hyphenstadium von *Candida*-Zellen vom Hefestadium zu unterscheiden und daher das Hyphenstadium zu charakterisieren und/oder nachzuweisen, wobei das Hyphenstadium dadurch charakterisiert ist, dass das erfindungsgemäße Zellwandprotein Rbr1p und/oder das erfindungsgemäße Zellwandprotein Rbr2p und/oder das erfindungsgemäße Zellwandprotein Rbr3p vorliegt/vorliegen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls sind also proteincodierende Nucleinsäuren, die ein zur Hyphenentwicklung eines pathogenen pilzlichen Organismus erforderliches Zellwandprotein, insbesondere das Zellwandprotein Rbr1p, das Zellwandprotein Rbr2p und/oder das Zellwandprotein Rbr3p codieren. Insbesondere handelt es sich um Nucleinsäuremoleküle, die die Sequenz des *RBR1*-Gens, des *RBR2*-Gens und/oder des *RBR3*-Gens von *C. albicans* aufweisen. Die *RBR1*-, *RBR2*- und *RBR3*-Gene ist sind pH- und/oder Temperatur-regulierte Gene, deren Expression durch den Repressor Nrg1p aktiviert und durch den Transkriptionsfaktor Rim101p reprimiert wird.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein hyphenspezifisches Zellwandprotein einer *Candida*-Spezies codieren, wobei die Nucleinsäuremoleküle zu den Nucleinsäuren, die das Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Protein von *C. albicans* codieren, über ihre gesamte Länge hinweg eine sehr

große Homologie aufweisen, wobei die Homologie mehr als 75 %, insbesondere mehr als 80 %, vorzugsweise mehr als 85 %, besonders bevorzugt mehr als 90 % und am bevorzugtesten mehr als 95 % oder mehr als 98 % beträgt. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Homologie“ der Grad der Identität verstanden, der zwischen den Nucleotidsequenzen von zwei Nucleinsäuremolekülen oder zwischen den Aminosäuresequenzen von zwei Protein-Molekülen besteht. Homologe Nucleinsäuren können mit der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz hybridisieren. Hybridisieren bedeutet im Rahmen der Erfindung eine Hybridisierung unter vorzugsweise stringenten Hybridisierungsbedingungen, wie sie in Sambrook et al., „Molecular cloning: A laboratory manual“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Ausgabe (1989), beschrieben sind.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann sowohl ein Wildtyp-Zellwandprotein, beispielsweise Rbr1p von *C. albicans* mit der in SEQ ID Nr. 2 dargestellten Aminosäuresequenz, Rbr2p von *C. albicans* mit der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz oder Rbr3p von *C. albicans* mit der in SEQ ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenz, als auch ein mutiertes Zellwandprotein oder ein Derivat davon codieren. Nucleinsäuren, die ein gegenüber Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p von *C. albicans* mutiertes Zellwandprotein beziehungsweise ein Derivat davon codieren, weisen eine Nucleinsäuresequenz auf, die gegenüber der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz an mindestens einer, vorzugsweise mehreren Positionen geändert, das heißt mutiert ist. „Mehrere Positionen“ bedeutet erfindungsgemäß, dass 2 bis maximal 150 Positionen, insbesondere 2 bis maximal 120 Positionen, vorzugsweise 2 bis maximal 90 Positionen, besonders bevorzugt 2

bis maximal 60 Positionen, und am bevorzugtesten 2 bis maximal 30 Positionen, 2 bis maximal 24 Positionen, 2 bis maximal 18 Positionen, 2 bis maximal 12 Positionen oder 2 bis maximal 6 Positionen in der Nucleinsäuresequenz mutiert sind, wobei die Homologie der ge-
5 änderte Positionen enthaltenden Nucleinsäuren über deren gesamte Länge hinweg zu der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz mehr als 75 %, insbesondere mehr al 80 %, vorzugsweise mehr als 85 %, besonders bevorzugt mehr als 90 % und am bevorzugtesten mehr als 95 %, 96 %, 97 %,
10 98 % oder 99 % beträgt.

Die Abweichungen gegenüber der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz, das heißt die Mutationen, können beispielsweise durch Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Additionen, Nucleotid-Austausche und/oder Rekombination entstanden sein. Bei den Mutationen kann es sich um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen, nahe verwandten Organismen oder anderen klinischen Isolaten der gleichen *Candida*-Spezies oder um auf natürliche Weise entstandene Mutationen. Es kann sich aber auch um
15 Mutationen handeln, die mit technischen Mitteln künstlich erzeugt wurden, beispielsweise durch UV-Strahlen, Röntgenstrahlen oder chemische Agenzien. Es kann sich aber auch um Sequenzänderungen handeln, die mittels gentechnischer Verfahren erzeugt wurden. Erfindungsgemäß können die Nucleinsäuremoleküle auch solche
20 Mutationen oder Abwandlungen der erfindungsgemäßen Nucleinsäure enthalten, die durch Fusion mit einem anderen Gen oder Bereichen eines solchen Genes aus der gleichen *Candida*-Spezies einer anderen *Candida*-Spezies oder einem anderen Organismus erzeugt wurden. Beispielsweise kann es sich um Nucleinsäuremoleküle han-
25

deln, die Bereiche des erfindungsgemäßen *RBR1*-Gens in Kombination mit Bereichen des erfindungsgemäßen *RBR2*-Gens und/oder Bereichen des erfindungsgemäßen *RBR3*-Gens aufweisen.

- Die erfindungsgemäße Nucleinsäure beziehungsweise das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann jedoch auch eine Nucleotidsequenz aufweisen, die gegenüber der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleotidsequenz verkürzt ist. Ein solches verkürztes Nucleinsäuremolekül kann ebenfalls ein vollständiges Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p bzw. Rbr3p oder aber nur ein Fragment davon, beispielsweise eine Protein-Domäne oder ein Epitop davon codieren. Unabhängig davon, ob das erfindungsgemäß verwendete, verkürzte Nucleinsäuremolekül ein vollständiges Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p bzw. Rbr3p oder nur ein Fragment davon codiert oder nicht, so muss sie in jedem Fall in der Lage sein, in Antisense-Orientierung die Protein-Expression der das Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p codierenden Nucleinsäure, beispielsweise einer das Wildtyp-Protein oder einer ein mutiertes Protein codierende Nucleinsäure, in deren natürlichen zellulären Umgebung oder in einem geeigneten Wirtssystem zu inhibieren. „Inhibieren“ bedeutet im Kontext der vorliegenden Erfindung entweder eine vollständige Blockierung oder zumindest eine teilweise Reduzierung der Transkription und/oder Translation der zu inhibierenden Nucleinsäure.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül um ein Molekül mit einer Nucleotidsequenz, die zu einer Nucleotidsequenz einer der vorgenannten Nucleinsäuremoleküle komplementär ist. Eine Nucleinsäure beziehungsweise eine Nucleotidsequenz ist „komplementär“ zu einer

anderen Nucleinsäure beziehungsweise Nucleotidsequenz, wenn sie über ihre gesamte Länge hinweg mit dieser einen Doppelstrang bilden kann, in dem alle Nucleotide nach den Regeln von Watson und Crick durch Wasserstoff-Brückenbindung gepaart vorliegen. Beispielsweise ist ein mRNA-Molekül komplementär zu einem der DNA-Strände eines Genes, von dem es codiert wird.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in isolierter und gereinigter Form vorliegen. Erfindungsgemäß ist ferner vorgesehen, dass das Nucleinsäuremolekül als DNA-, RNA-, PNA-, LNA-Molekül oder als Mischform davon vorliegt. Bei „PNA“ („Peptide Nucleic Acid“ oder „Polyamide Nucleic Acid“)-Sequenzen handelt es sich um Moleküle, die nicht negativ geladen sind und in gleicher Weise wie DNA wirken (Nielsen et al., Science, 254 (1991), 1497-1500; Nielsen et al., Biochemistry, 26 (1997), 5072-5077; Weiler et al., Nuc. Acids Res., 25 (1997), 2792-2799). PNA-Sequenzen umfassen ein Polyamid-Grundgerüst aus N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten und besitzen keine Glucose-Einheiten und keine Phosphat-Gruppen. Die unterschiedlichen Basen sind über Methylen-Carbonyl-Bindungen an das Grundgerüst gebunden. „LNA“ (Locked Nucleic Acid)-Moleküle sind dadurch gekennzeichnet, dass die Furanose-Ring-Konformation durch einen Methylen-Linker beschränkt ist, der die 2'-O-Position mit der 4'-C-Position verbindet. LNAs werden als einzelne Nucleotide in Nucleinsäuren, beispielsweise DNA- oder RNA, eingebaut. LNA-Moleküle unterliegen ebenfalls wie PNA-Moleküle den Watson-Crick-Basenpaarungs-Regeln und hybridisieren mit komplementären DNA- und/oder RNA-Molekülen. LNA/DNA- oder LNA/RNA-Duplexmoleküle zeigen gegenüber ähnlichen Duplexmolekülen, die

ausschließlich aus DNA oder RNA gebildet sind, erhöhte thermische Stabilität.

Die erfindungsgemäß eingesetzte Nucleinsäuremoleküle können aus einer natürlichen Quelle isoliert worden sein, vorzugsweise aus Zellen von *C. albicans* oder einer anderen *Candida*-Spezies. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können aber auch mittels eines bekannten Verfahrens chemisch synthetisiert worden sein.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Fragment eines Nucleinsäuremolekules, dass ein zur Hyphenentwicklung eines pathogenen pilzlichen Organismus erforderliches Zellwandprotein, insbesondere das Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p von *C. albicans*, codiert. Unter einem „Fragment“ eines Nucleinsäuremoleküls wird ein Teilbereich eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls verstanden, das in der natürlichen zellulären Umgebung des erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls oder in einem geeigneten Wirtssystem die Protein-Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäure, die ein Zellwandprotein codiert, inhibieren kann. „Inhibieren“ bedeutet im Kontext der vorliegenden Erfindung entweder eine vollständige Blockierung oder zumindest eine teilweise Reduzierung der Transkription und/oder Translation der zu inhibierenden Nucleinsäure. Eine in Antisense-Orientierung vorliegende Nucleinsäure oder ihre mRNA ist zu der mRNA einer zu inhibierenden Nucleinsäure komplementär und verbindet sich mit dieser zu einem doppelsträngigen Nucleinsäuremolekül, das enzymatisch abgebaut wird. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist das erfindungsgemäße Fragment mindestens 10 Nucleotide auf. In weiteren Ausführungsformen weist das Fragment mindestens 15, insbesondere mindestens 25, vorzugsweise mindestens

tens 50 und besonders bevorzugt mindestens 100 Nucleotide auf. Das erfindungsgemäße Fragment kann daher auch ein Oligonucleotid sein. Die Homologie des erfindungsgemäßen Fragmentes über seine gesamte Länge hinweg zu der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz beträgt mindestens 75 %, insbesondere mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 85 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, und am bevorzugtesten mindestens 95 %, 96 %, 97 %, 98 % oder 99 %.

Weitere Ausführungsformen der Erfindung betreffen einen Vektor, der mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül und/oder mindestens ein Nucleinsäure-Fragment unter der funktionalen Kontrolle von mindestens einem Expressions-Regulationselement enthält, dass die Transkription der Nucleinsäure in eine translatierbare RNA und/oder die Translation der RNA in ein Protein gewährleistet. Bei dem Vektor handelt es sich vorzugsweise um ein Plasmid, ein Cosmid, ein Virus, einen Bakteriophagen, einen Shuttle-Vektor oder einen anderen in der Gentechnik üblicherweise eingesetzten Vektor. Geeignete regulatorische Elemente sind beispielsweise Promotoren, Enhancer, Operatoren, Silencer, Ribosomen-Bindungsstellen und/oder Transkriptions-Terminationssignale, beispielsweise einen 3'-Transkriptionsterminator. Die regulatorischen Elemente, die funktionell mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, beispielsweise dem Nucleinsäuremolekül mit der in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, verbunden sind, können aus anderen Organismen oder anderen Genen stammen als die Nucleinsäuremoleküle selbst. Selbstverständlich können die funktionell mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen verbundenen Regulationselemente auch aus *Candida*, insbesondere *C. albicans* stammen. Erfindungsgemäß ist ebenfalls vorgesehen, dass

der Vektor eine Signalsequenz zum Transport des von dem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül codierten; exprimierten Proteins in eine Zellorganelle, ein Zellkompartiment, in den extrazellulären Raum oder aus der Zelle heraus aufweist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Antisense-Orientierung zu dem/den funktionell damit verbundenen regulatorischen Element(en) vorliegen, sodass eine Expression einer Antisense-mRNA ermöglicht wird, die in einem Zielorgan die Expression des endogenen *C. albicans-RBR1*-Gens, des endogenen *C. albicans-RBR2*-Gens beziehungsweise des endogenen *C. albicans-RBR3*-Gens inhibieren oder reduzieren kann. Bei Verwendung eines Fragmentes der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle muss dieses eine Länge aufweisen, die ausreicht, um eine Hybridisierung und eine Translations-Inhibition zu ermöglichen, beispielsweise eine Länge von mindestens 10 Nucleotiden, insbesondere mindestens 15, mindestens 25, vorzugsweise mindestens 50 und besonders bevorzugt mindestens 100 Nucleotiden.

Die erfindungsgemäßen Vektoren können noch weitere Funktions-einheiten besitzen, die beispielsweise eine Stabilisierung und/oder Replikation des Vektors in einem Wirtsorganismus bewirken oder zumindest dazu beitragen. Die erfindungsgemäßen Vektoren können selbstverständlich auch Elemente wie Antibiotikaresistenz-Gene, Selektionsmarker oder Nucleinsäure-Bereiche enthalten, die Affinitätsepitope wie HA, Myc, Maltose-binding-Protein, His6 oder fluoreszierende Proteine wie Luciferase oder Gfp codieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls eine Wirtszelle, die eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle

und/oder einen oder mehrere der vorstehend genannten Vektoren enthält und in bevorzugter Ausführungsform in der Lage ist, das erfindungsgemäße Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p zu exprimieren. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls auch solche

5 Zellen, die von einer Wirtszelle abstammen, die mit den vorstehend genannten erfindungsgemäßen Nucleinsäuren und/oder Vektoren transformiert wurde. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen prokaryotische oder eukaryotische Zellen wie Bakterien-, Hefe-, Pflanzen-, Insekten- oder Säugerzellen, insbesondere auch

10 menschliche Zellen. Eine erfindungsgemäße Wirtszelle kann dadurch gekennzeichnet sein, dass das eingeführte erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül beziehungsweise das in dem Vektor enthaltene Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die transformierte Zelle ist. Das heißt, dass das Nucleinsäuremolekül, das ein Zellwandprotein von *Candida* codiert, natürlicherweise nicht in dieser Zelle vorkommt oder aber an einem anderen Ort oder in einer anderen Kopiezahl oder Orientierung im Genom der Wirtszelle lokalisiert ist als die entsprechende natürlicherweise vorkommende Nucleinsäure.

15 Das eingeführte erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann in Bezug auf die transformierte Zelle aber auch homolog sein.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die erfindungsgemäße Wirtszelle eine gram-negative prokaryotische Zelle, besonders bevorzugt eine Enterobakterien-Zelle. Besonders bevorzugt ist die erfindungsgemäße Wirtszelle eine *Escherichia coli*-Zelle.

25 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die erfindungsgemäße Wirtszelle auch eine eukaryotische Zelle sein, insbesondere ein Pilzzelle, zum Beispiel eine Zelle aus der Gattung *Candida*, vorzugsweise *C. albicans*, eine *Saccharomyces*-Zelle oder eine tierische Zelle, insbesondere eine Insekten- oder Säugerzelle.

Besonders bevorzugte Beispiele für geeignete *C. albicans*-Wirtszellen sind Abkömmlinge des Stammes SC5314 (Fonzi und Irwin, Genetics, 134 (1993), 717-728). Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, dass die erfindungsgemäße Wirtszelle in Form einer
5 Zellkultur vorliegen kann.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird auch durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines zur Hyphenentwicklung eines pathogenen pilzlichen Organismus erforderlichen Zellwandproteins, insbesondere des Rbr1p-
10 Proteins, des Rbr2p-Proteins und des Rbr3p-proteins von *Candida albicans*, gelöst, umfassend die Kultivierung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle in einem geeigneten Kulturmedium unter Bedingungen, die eine Expression des Zellwandproteins erlauben, und die Gewinnung des exprimierten Zellwandproteins aus der Zelle oder
15 aus dem Medium. Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Kultivierung von prokaryotischen und eukaryotischen Wirtszellen in Kulturmedium sowie die Kultivierungsbedingungen, die zur Expression von Proteinen führen, bekannt. Der Fachmann kennt ebenfalls zahlreiche Verfahren zur Isolierung von exprimierten Proteinen aus
20 einer Zelle und/oder aus dem Kulturmedium.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Protein, das die in SEQ ID Nr. 2 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist und von der in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird. In bevorzugter Ausführungsform handelt es sich bei dem Protein um
25 das Rbr1p-Protein von *C. albicans*, wobei das erfindungsgemäße Protein unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung des zur Hyphenentwicklung erforderlichen Zellwandproteines hergestellt werden kann.

Die Erfindung betrifft auch ein Protein, das die in SEQ ID Nr. 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist und von der in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird. In bevorzugter Ausführungsform handelt es sich bei dem Protein um das Rbr2p-Protein
5 von *C. albicans*, wobei das erfindungsgemäße Protein unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung des zur Hyphenentwicklung erforderlichen Zellwandproteines hergestellt werden kann.

Die Erfindung betrifft ferner ein Protein, das mindestens die in SEQ
10 ID Nr. 6 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist und von der in SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird. In bevorzugter Ausführungsform handelt es sich bei dem Protein um das Rbr3p-Protein von *C. albicans*, wobei das erfindungsgemäße Protein unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung des zur Hyphenentwicklung erforderlichen Zellwandproteines
15 hergestellt werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Antikörper, die spezifisch ein erfindungsgemäßes Zellwandprotein, insbesondere das erfindungsgemäße Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p von *C. albicans*, erkennen und daran binden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Antikörper“ ein Polypeptid verstanden, das im Wesentlichen von einem Immunglobulin-Gen oder mehreren Immunglobulin-Genen codiert wird, oder Fragmente davon, das/die ein Antigen spezifisch bindet/bindet und erkennt/erkennen. Bekannte Immunglobulin-Gene umfassen sowohl die kappa-, lambda-, alpha-, gamma-, delta-, epsilon- und mu-Gene für den konstanten Bereich als auch die zahlreichen Gene für den variablen Immunglobulin-Bereich. Antikörper können beispielsweise
20
25

als intakte Immunglobuline oder als eine Reihe gut charakterisierter Fragmente davon, die mittels Spaltung mit verschiedenen Peptid-
asen erzeugt werden, vorliegen. Der in der vorliegenden Beschrei-
bung verwendete Begriff „Antikörper“ umfasst daher sowohl intakte
5 Antikörper-Moleküle als auch Fragmente davon. Bei den Antikörper-
Fragmenten handelt es sich insbesondere um Fragmente wie Fab,
F(ab')₂ und Fv, die die Epitop-Determinante binden können. Die
Fragmente können entweder mittels Modifikation vollständiger, gan-
ziger Antikörper oder mittels De novo-Synthese unter Verwendung von
10 DNA-Rekombinationstechniken erzeugt worden sein. Der Begriff
„Antikörper“ umfasst auch modifizierte Antikörper, beispielsweise
oligomere, reduzierte, oxidierte und/oder markierte Antikörper. Bei
dem Antikörper kann es sich sowohl um einen mononalen als
15 auch polyclonalen Antikörper handeln. Verfahren zur Herstellung von
monoclonalen und polyclonalen Antikörpern sind im Stand der Tech-
nik bekannt.

Ein gegen das erfindungsgemäße Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-
Zellwandprotein gerichteter erfindungsgemäßer Antikörper erkennt
daher spezifisch das Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Protein und bindet
20 spezifisch daran. Vorzugsweise binden die erfindungsgemäßen Anti-
körper oder Antikörper-Fragmente keine anderen Antigene, bei-
spielsweise andere an der Zellwand von *Candida* vorhandene Prote-
ine. In bevorzugter Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßer, ge-
gen das Zellwandprotein Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Protein gerichte-
25 ter Antikörper in der Lage, spezifisch nur das Zellwandprotein Rbr1p-
Protein oder das Rbr2p-Zellwandprotein oder das Rbr3p-
Zellwandprotein einer *Candida*-Spezies zu erkennen und daran zu
binden. Das heißt, ein gegen das Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Protein
von *C. albicans* gerichteter Antikörper erkennt und bindet aus-

- schließlich das Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Protein von *C. albicans*, nicht jedoch das entsprechende Rbr1p-Protein, das entsprechende Rbr2p-Protein beziehungsweise das entsprechende Rbr3p-Protein einer verwandten *Candida*-Spezies, beispielsweise das Rbr1p-
5 Protein, Rbr2p- oder Rbr3p-Protein von *C. glabrata*. Umgekehrt erkennt und bindet ein gegen das Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Protein von *C. glabrata* gerichtete Antikörper nicht das entsprechende Protein von *C. albicans*.
- Selbstverständlich können die erfindungsgemäßen Antikörper oder
10 Fragmente modifiziert sein, zum Beispiel mit anderen Molekülen oder anderen Teilen davon konjugiert, assoziiert oder kovalent oder nicht-kovalent gebunden sein, zum Beispiel mit einer Farbmarkierung, einer radioaktiven Markierung, einem eine messbare Reaktion auslösenden Enzym, wie einer Phosphatase oder Peroxidase, Enzymsubstraten, fluoreszierenden Substanzen, chemilumineszenten Substanzen, cytotoxischen Agenzien, Spacern, Trägerstoffen oder ähnlichem. Die markierten, konjugierten oder nicht-modifizierten Antikörper können in löslicher oder immobilisierter Form, beispielsweise auf Trägermatrices oder Beads wie Nanopartikeln vorliegen.
15
- 20 Die vorliegende Erfindung betrifft selbstverständlich auch einen Antikörper, der einen gegen das Zellwandprotein Rbr1p gerichteten Antikörper und/oder einen gegen das Zellwandprotein Rbr2p gerichteten Antikörper und/oder einen gegen das Zellwandprotein Rbr3p gerichteten Antikörper spezifisch erkennt und daran bindet.
- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des Hyphenstadiums von *Candida*-Zellen oder Zellen pathogener pilzlicher Organismen, die mit *Candi-*

da verwandt sind, umfassend die Inkubation der Zellen oder Zellfraktionen davon mit einem Mittel zur Identifizierung des Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p, Rbr3p, eines homologen Proteins davon und/oder eines Fragmentes davon, wobei der Nachweis des Proteins oder 5 eines Fragmentes davon das Vorliegen des virulenten Hyphenstadiums der Zellen anzeigt.

Die vorliegende Erfindung löst also das ihr zugrundeliegende technische Problem auch durch die Bereitstellung von Protein-Markern, nämlich der Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p von *Candida*, 10 mit deren Hilfe es möglich ist, das Hyphenstadium von *Candida*-Zellen eindeutig und exakt zu bestimmen. Da Rbr1p, Rbr2p und Rbr3p nur in der Zellwand von hyphal wachsenden *Candida*-Zellen vorkommen, stellen die drei Proteine ideale Marker dar, mit deren Hilfe das hyphale Differenzierungsstadium von *Candida*-Zellen, bei- 15 spielsweise *C. albicans*-Zellen, eindeutig und schnell nachgewiesen und so zwischen Hefezellen und Hyphenzellen klar unterschieden werden kann. Die Analyse und Bestimmung des hyphalen Entwicklungsstadiums von *Candida* unter Verwendung der erfindungsgemäß Rbr1p-, Rbr2p- und Rbr3p-Proteine liefert somit auch wichtige 20 Informationen zur Virulenz des Pilzes.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „immunologisches Mittel“ insbesondere ein gegen das Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichtetes Antiserum, ein gegen das Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichteter Antikörper oder ein Fragment davon oder ein Komplex davon verstanden. Unter einem „Antiserum“ wird ein Serum verstand, das Antikörper gegen ein monospezifisches Antigen oder mehrere Antigene beziehungsweise Epitope enthält. Das Antiserum wird aus spezifisch zu 25

diesem Zweck immunisierten Tieren oder von Menschen, die eine bestimmte Erkrankung, insbesondere eine durch *Candida*-Arten verursachte Erkrankung durchgemacht haben, gewonnen. Aufgrund der Heterogenität der Immunantwort enthält das gegen ein Antigen, beispielsweise das gegen Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichtete Antiserum unterschiedliche Antikörper, sogenannte polyclonale Antikörper, die von verschiedenen Plasma-Zellklonen produziert werden. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass der Nachweis von Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p oder eines Fragmentes davon durch das immunologische Mittel mittels eines Fluoreszenz-Verfahrens, eines Chemiluminiszenz-Verfahrens, eines immunologischen Verfahrens oder eines radiometrischen Verfahrens erfolgt. Das Verfahren zum Nachweis des Vorliegens des Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p kann gegebenenfalls in Kombination mit einem mikroskopischen Verfahren und einem Bildauswertungsverfahren erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des Hyphenstadiums von *Candida*-Zellen ist das Zellwandprotein Rbr1p das Zellwandprotein Rbr1p von *C. albicans*, das von einer Nucleinsäure mit der in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird und die in SEQ ID Nr. 2 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des Hyphenstadiums von *Candida*-Zellen ist das Zellwandprotein Rbr2p das Zellwandprotein Rbr2p von *C. albicans*, das von einer Nucleinsäure mit der in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird und die in SEQ ID Nr. 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens zur Charakte-

risierung und/oder zum Nachweis des Hyphenstadiums von *Candida*-Zellen ist das Zellwandprotein Rbr3p das Zellwandprotein Rbr3p von *C. albicans*; das von einer Nucleinsäure mit der in SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird und die in SEQ ID 5 Nr. 6 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.

In weiteren Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Zellwandprotein Rbr1, Rbr2p oder Rbr3p das Rbr1-Protein, Rbr2p-Protein oder Rbr3p-Protein beziehungsweise ein homologes Protein dazu von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, einer *Trichosporon*-Art oder einer *Blastoschizomyces*-Art, wobei der Nachweis des Proteins vorzugsweise unter Verwendung eines Antikörpers erfolgt, der spezifisch gegen das Rbr1p-Zellwandprotein, das Rbr2p-Zellwandprotein beziehungsweise das Rbr3p-Zellwandprotein von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *Trichosporon* oder *Blastoschizomyces* gerichtet ist. Dadurch wird erfindungsgemäß das hyphale Differenzierungsstadium von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *Trichosporon* 10 beziehungsweise *Blastoschizomyces* charakterisiert und/oder nachgewiesen. Antikörper gegen das Rbr1p-Zellwandprotein, das Rbr2p-Zellwandprotein beziehungsweise das Rbr3p-Zellwandprotein aus einer der genannten *Candida*-Spezies können beispielsweise hergestellt werden, indem das Rbr1p-Zellwandprotein, das Rbr2p-Zellwandprotein oder das Rbr3p-Zellwandprotein aus Zellen der entsprechenden *Candida*-Spezies isoliert und dann unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren zur Erzeugung eines monoklonalen oder polyclonalen Antikörpers eingesetzt wird. Das 15 Rbr1p-Zellwandprotein, das Rbr2p-Zellwandprotein beziehungsweise 20 25

das Rbr3p-Zellwandprotein einer *Candida*-Spezies kann auch unter Verwendung einer der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenzen erhalten werden, indem diese zur Isolierung einer homologen Nucleinsäure aus Zellen der 5 entsprechenden *Candida*-Spezies eingesetzt wird. Nach Isolierung und Sequenzierung der homologen Nucleinsäure kann dann auf der Basis der erhaltenen Nucleinsäuresequenz die Aminosäuresequenz des von der Nucleinsäure codierten Rbr1p-Zellwandproteines, die Aminosäuresequenz des von der Nucleinsäure codierten Rbr2p- 10 Zellwandproteines beziehungsweise die Aminosäuresequenz des von der Nucleinsäure codierten Rbr3p-Zellwandproteines abgeleitet werden. Das entsprechende Protein kann dann beispielsweise *in vitro* chemisch synthetisiert und zur Herstellung eines spezifisch dagegen gerichteten Antikörpers eingesetzt werden.

15 Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die zu charakterisierenden *Candida*-Zellen in einer Probe, vorzugsweise einer biologischen Probe vorliegen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „biologischen Probe“ insbesondere ein Haut- oder Schleimhautabstrich, eine Organbiopsie, eine Gewebebiopsie, eine 20 Körperflüssigkeit, ein Körpersekret, Stuhl oder eine Spülflüssigkeit verstanden, die durch Spülung von Hohlräumen oder Hohlorganen eines menschlichen oder tierischen Körpers gewonnen wurde. Die Probe kann sowohl einem lebenden oder toten Organismus, Organ oder Gewebe entnommen worden sein. Bei einer „Biopsie“ handelt 25 es sich um eine durch Punktion mit einer Hohlnadel, unter Anwendung eines speziellen Instrumentes wie eines Stanzinstrumentes, einer Biopsiesonde oder einer Zange oder operativ mit dem Skalpell gewonnene Gewebeprobe. Bei einer „Körperflüssigkeit“ handelt es sich insbesondere um Sputum, Urin, Pleuraerguss, Liquor, Lymphe

oder Blut. Erfindungsgemäß bevorzugt kann das Blut sowohl eine ungereinigte als auch eine gereinigte Blutprobe, Blutplasma oder Blutserum sein. „Sekrete“ sind Absonderungen von Zellen, insbesondere Drüsen.

- 5 Eine „biologische Probe“ kann erfindungsgemäß auch eine Kultur, beispielsweise eine Blutkultur, also ein Keimanzüchtung aus einer Blutprobe, oder ein Kulturmedium sein, beispielsweise ein Fermentationsmedium, in dem *Candida*-Zellen oder menschliche, tierische oder pflanzliche Zellen kultiviert wurden. Bei einer Probe im Sinne
10 der Erfindung kann es sich auch um eine wässrige Lösung, Emulsion, Dispersion oder Suspension handeln, die isolierte und aufgereinigte *Candida*-Zellen oder Bestandteile davon enthält. Eine biologische Probe kann bereits Aufreinigungsschritten unterworfen worden
15 sein, um *Candida*-Zellen zu isolieren oder anzureichern, kann aber auch ungereinigt vorliegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei den eingesetzten, zu charakterisierenden *Candida*-Zellen um Zellen, die aus einer biologischen Probe isoliert und angereichert wurden und als Zellpräparat, vorzugsweise in einem geeigneten Puffersystem vorliegen. Bei den *Candida*-Zellen handelt es sich vorzugsweise um intakte Zellen.
20

Erfindungsgemäß ist ebenfalls vorgesehen, dass zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des hyphalen Differenzierungsstadiums von *Candida*-Zellen auch Zellfraktionen eingesetzt werden, die
25 durch Aufschluss und Fraktionierung von *Candida*-Zellen erhalten werden, wobei isolierte und vorzugsweise aufgereinigte Zellfraktionen erhalten werden. Diese so erhaltenen Zellfraktionen können

dann im erfindungsgemäßen Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des Hyphenwachstumsstadiums von *Candida*-Zellen eingesetzt werden. Verfahren zum Zellaufschluss und zur Fraktionierung von Zellbestandteilen sind auf dem Fachgebiet 5 gut bekannt. Vorzugsweise umfassen die zur Charakterisierung der Differenzierungsstadien von *Candida*-Zellen eingesetzten Zellfraktionen mindestens eine Zellwand-Fraktion der *Candida*-Zellen.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird auch durch ein Verfahren zum Nachweis einer *Candida*-Infektion in einer aus einem menschlichen oder tierischen Organismus erhaltenen biologischen Probe gelöst, wobei die Gegenwart des Proteins Rbr1p, Rbr2p, Rbr3p, eines homologen Proteins davon und/oder eines Fragmentes davon in der biologischen Probe und/oder in der Zellwand von gegebenenfalls in der biologischen 10 Probe enthaltenen *Candida*-Zellen oder Zellen von mit *Candida* verwandten pathogenen Organismen nachgewiesen wird, umfassend 15

- a) die Inkubation der biologischen Probe mit einem Mittel zur Identifizierung des Proteins Rbr1p, Rbr2p, Rbr3p, eines homologen Proteins davon und/oder eines Fragmentes davon und
- 20 b) den Nachweis der Interaktion des Identifizierungsmittels mit dem Protein oder Fragment davon.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis einer *Candida*-Infektion beruht also entweder auf dem direkten Nachweis des in der Probe frei vorliegenden Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Zellwandproteins 25 von *Candida* beziehungsweise eines Teils davon oder aber auf dem Nachweis, dass das Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p in der Zellwand von *Candida*-Zellen, die in der Probe enthalten sind, vor-

handen ist. In beiden Fällen weist der Nachweis von Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p auf das Vorkommen virulenter hyphaler *Candida*-Zellen und damit auf das Vorliegen einer *Candida*-Infektion hin. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt somit in vorteilhafter Weise 5 einen schnellen und exakten Nachweis einer *Candida*-Infektion, insbesondere einer invasiven Candidiasis. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht also insbesondere eine sehr frühe Diagnose der Mykose.

Der erfindungsgemäße direkte Nachweis des *Candida*-Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p in einer Probe oder in der Zellwand von in der Probe enthaltenen *Candida*-Zellen, insbesondere der immunologische Nachweis des Zellwandantigens mittels eines gegen das Zellwandprotein Rbr1p, das Zellwandprotein Rbr2p oder das Zellwandprotein Rbr3p gerichteten Antikörpers, hat gegenüber den derzeit bekannten Diagnose-Verfahren einen erheblich höheren diagnostischen Wert. So ermöglicht der derzeit durchgeführte kulturelle und/oder histologische Nachweis von *Candida* in den meisten Fällen lediglich den Nachweis einer *Candida*-Infektion im Spätstadium, während sich frühe Stadien insbesondere bei immun-supprimierten Patienten diesem Nachweis häufig entziehen. Auch die derzeit erfassten Antikörper-Titer gegen *Candida*-Antigene eignen sich bislang kaum oder überhaupt nicht zur Diagnose einer *Candida*-Infektion. Die Ursachen dafür sind vielfältig. So ist bekannt, dass gesunde Personen Antikörper gegen *Candida*-Antigene aufweisen. Andererseits entwickeln manche Patienten, insbesondere immunsupprimierte Patienten, bei einer *Candida*-Infektion sehr häufig keine adäquate Immunreaktion. Eine weitere Ursache besteht darin, dass häufig Serumproben entnommen werden, bevor sich Antikörper gebildet haben.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „*Candida*-Infektion“ eine „*Candida*-Mykose“ oder Candidose oder Candidiasis verstanden, also eine Infektion, Krankheit oder ein Krankheitszustand, der durch eine *Candida*-Art verursacht wird. Ins-
5 besondere handelt es sich um solche Erkrankungen, die ausschließlich von *Candida*-Arten verursacht werden. Der Begriff „*Candida*-Infektion“ umfasst alle Erkrankungen, die von *Candida*-Arten wie *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, einer *Trichosporon*-Art oder
10 einer *Blastoschizomyces*-Art verursacht werden. Im Kontext mit der Erfindung werden unter dem Begriff „*Candida*-Infektionen“ auch Krankheiten oder Krankheitszustände verstanden, die primär andere Ursachen haben und bei denen die vorstehend genannten *Candida*-Arten am Gesamtkrankheitsbild nur beteiligt sind beziehungsweise
15 zusätzliche Symptome hinzufügen, zum Beispiel opportunistische Infektionen.

Unter einer invasiven „Candidiatis“ werden erfindungsgemäß *Candida*-Infektionen im Blutkreislauf und in inneren Organen verstanden. Invasive Candidiatis tritt insbesondere dann auf, wenn Zellen einer
20 *Candida*-Spezies in den Blutkreislauf gelangen, dort zu einer Infektion führen und sich von da aus über den gesamten Körper verteilen. Zu den häufigsten Symptomen invasiver Candidiatis gehören Fieber und Schüttelfrost. Wenn sich die Infektion zu tiefer gelegenen Organen wie Nieren, Leber oder Augen ausbreitet, können sich zusätzlich
25 spezifische Symptome entwickeln.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass zur Identifizierung von Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p als Zelloberflächen-Antigen von *Candida*-Zellen oder aber als freies, insbesondere in Körperflüssigkeiten zir-

kulierendes Antigen ein immunologisches Mittel eingesetzt wird, insbesondere ein gegen Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichtetes Antiserum, ein gegen Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichteter Antikörper oder ein Fragment davon oder ein Komplex davon. Der erfindungsgemäß 5 eingesetzte Antikörper kann sowohl ein monoklonaler als auch ein polyclonaler Antikörper sein, der vorzugsweise eine Markierung, insbesondere eine Farbmarkierung, eine radioaktive Markierung, eine Fluoreszenzmarkierung, eine Chemielumineszenz-Markierung oder ein messbares Reaktion auslösendes Enzym aufweist. Die Untersuchung der Interaktion des Identifizierungsmittels, vorzugsweise 10 des Antikörpers, mit dem Rbr1p-Zellwandantigen, Rbr2p-Zellwandantigen oder Rbr3p-Zellwandantigen erfolgt erfindungsgemäß mittels eines immunologischen Verfahrens, eines Fluoreszenz-Verfahrens, eines Chemielumineszenz-Verfahrens oder eines radiometrischen Verfahrens, gegebenenfalls in Kombination mit einem 15 mikroskopischen Verfahren und/oder einem Bildauswertungsverfahren.

In bevorzugter Ausführungsform ist das nachzuweisende Protein das Zellwandprotein Rbr1p von *C. albicans*, das von einem Nucleinsäuremolekül mit der in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird und das die in SEQ ID Nr. 2 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das nachzuweisende Protein das Zellwandprotein Rbr2p von *C. albicans*, das von einem Nucleinsäuremolekül mit der in SEQ ID 20 Nr. 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird und das die in SEQ ID Nr. 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das nachzuweisende Protein das Zellwandprotein Rbr3p von *Candida albicans*, das von einem Nucleinsäuremolekül mit der in SEQ ID Nr. 5 dargestellten 25

Nucleinsäuresequenz codiert wird und das die in SEQ ID Nr. 6 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist. Durch den Nachweis von Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p von *C. albicans* in der Probe beziehungsweise den Nachweis von *C. albicans*-Rbr1p, *C. albicans*-Rbr2p und/oder *C. albicans*-Rbr3p in der Zellwand von *Candida*-Zellen, die in der biologischen Probe enthalten sind, können erfindungsgemäß invasive Pilzerkrankungen nachgewiesen werden, die insbesondere durch *C. albicans* verursacht werden, insbesondere eine durch *C. albicans* verursachte invasive Candidiadis. Durch den Nachweis des Rbr1p-Proteins, Rbr2p-Proteins oder Rbr3p-Proteins von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* einer Trichosporon-Art oder einer Blastoschizomyces-Art können erfindungsgemäß invasive Pilzerkrankungen nachgewiesen werden, die insbesondere von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, einer Trichosporon-Art beziehungsweise einer Blastoschizomyces-Art verursacht werden, insbesondere eine durch eine der genannten *Candida*-Spezies verursachte invasive Candidiadis.

Erfindungsgemäß ist ferner vorgesehen, dass der Nachweis der *Candida*-Infektion unter Verwendung einer biologischen Probe erfolgt, die *Candida*-Zellen enthalten kann, aber nicht enthalten muss. Die biologische Probe kann beispielsweise ein Haut- oder Schleimhautabstrich, eine Organbiopsie, eine Gewebebiopsie, eine Körperflüssigkeit, ein Körpersekret, Stuhl oder eine Spülflüssigkeit sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt der Nachweis der *Candida*-Infektion unter Verwendung einer Körperflüssigkeit, die im Vergleich zu anderen Proben wie einer Biopsie den Vorteil aufweisen, dass die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass

Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p frei zirkulieren. Bei der Körperflüssigkeit handelt es sich insbesondere um eine Blutprobe, die dem Körper direkt entnommen und ohne weitere Aufreinigung im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann. Das erfindungsgemäß 5 Be Verfahren kann auch unter Verwendung einer Blutkultur durchgeführt werden. Ebenfalls können erfindungsgemäß Blutprodukte wie Blutplasma oder Blutserum eingesetzt werden. Der Nachweis des frei im Blut zirkulierenden Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p beziehungsweise den Nachweis, dass im Blut enthaltene 10 *Candida*-Zellen auf ihrer Zelloberfläche Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p aufweisen, kann eine invasive Candidiasis im Blut nachgewiesen werden. Dass zur Identifizierung von Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p eingesetzte Mittel ist vorzugsweise ein immunologisches Mittel, insbesondere ein gegen Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichtetes 15 Antiserum, ein gegen Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichteter Antikörper oder ein Fragment davon oder ein Komplex davon. Im Falle der Verwendung eines Antikörpers kann dieser eine Markierung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Farbmarkierung, einer radioaktiven Markierung, einer Fluoreszenzmarkierung, einer Chemilumineszenz-Markierung oder einem messbaren Reaktion 20 auslösenden Enzym, aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zum Auffinden und Identifizieren von Substanzen mit therapeutischer Wirkung gegen Krankheiten, die durch *Candida*-Arten oder pathogene 25 pilzliche Arten, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden. Erfindungsgemäß ist dabei vorgesehen, dass eine zu testende Substanz in einem geeigneten Medium mit mindestens einem Agens, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül, einem erfindungsgemäßen Nucleinsäure-

Fragment, einem erfindungsgemäßen Vektor, einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, einem erfindungsgemäßen Zellwandprotein oder einem gegen dieses Zellwandprotein gerichteten Antikörper in Kontakt gebracht und eine Interaktion zwischen der zu testenden Substanz und dem Agens nachgewiesen wird.

Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die erfindungsgemäßen Fragmente dieser Nucleinsäuremoleküle, die erfindungsgemäßen Proteine oder die erfindungsgemäßen Antikörper auf entsprechenden Chips immobilisiert werden. Diese Chips können dann anschließend zum Nachweis einer Interaktion zwischen einer zu testenden Substanz und dem auf den Chips immobilisierten Agens in einem geeigneten Medium mit der zu testenden Substanz in Kontakt gebracht werden. Auf diese Weise können beispielsweise die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, Proteine beziehungsweise Antikörper verwendet werden, um Substanzen, beispielsweise Proteine, zu identifizieren, die *in vivo* an Nucleotidsequenzen, die hyphenspezifisch exprimierte Zellwandproteine wie Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p codieren beziehungsweise die Expression dieser Proteine regulieren oder an die hyphenspezifisch exprimierten Zellwandproteine selbst binden. Solche bindenden Substanzen, insbesondere Proteine, können potentiell als Medikamente gegen *Candida*-verursachte Krankheiten eingesetzt werden, wenn sie beispielsweise in der Lage sind, durch Bindung an regulatorische Nucleotidsequenzen die Transkription der erfindungsgemäßen hyphenspezifischen Zellwandproteine zu hemmen oder zu unterbinden oder wenn sie durch Bindung an die erfindungsgemäßen hyphenspezifisch exprimierten Zellwandproteine deren Aktivität hemmen oder unterbinden können. Wenn solche Substanzen, die an erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle oder Proteine binden, die

Transkription der erfindungsgemäßen hyphenspezifischen Zellwandproteine induzieren oder fördern oder die Aktivität der erfindungsgemäßen hyphenspezifisch exprimierten Zellwandproteine begünstigen, können diese Substanzen potenziell als Medikamente zur Behandlung *Candida*-verursachter Krankheiten verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls eine diagnostische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäure-Fragment, mindestens einen erfindungsgemäßigen Vektor, mindestens eine erfindungsgemäßige Wirtszelle, mindestens ein erfindungsgemäßes Protein und/oder mindestens einen erfindungsgemäßigen Antikörper.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäure-Fragment, mindestens einen erfindungsgemäßigen Vektor, mindestens eine erfindungsgemäßige Wirtszelle, mindestens ein erfindungsgemäßes Protein, mindestens einen erfindungsgemäßigen Antikörper und/oder mindestens eine Substanz, deren therapeutische Wirksamkeit mittels des erfindungsgemäßigen Verfahrens zum Identifizieren von Substanzen mit therapeutischer Wirkung nachgewiesen wurde.

Die in der erfindungsgemäßigen diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene Nucleinsäure kann also eine Protein-codierende Nucleinsäure sein, insbesondere eine Nucleinsäure, die das erfindungsgemäßige Zellwandprotein Rbr1p von *C. albicans*, das erfindungsgemäßige Zellwandprotein Rbr2p von *C. albi-*

- cans oder das erfindungsgemäße Zellwandprotein Rbr3p von *C. albicans* codiert. Die in der diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene Nucleinsäure kann aber auch eine Nucleinsäuresequenz enthalten, die Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p von
- 5 *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, einer Trichosporon-Art oder einer Blastoschizomyces-Art codiert. Die Nucleinsäuren, die eines der Proteine aus einer der vorgenannten *Candida*-Spezies codieren, weisen zu einer *C. albicans*-Rbr1p, *C. albicans*-Rbr2p oder *C. albicans*-
- 10 Rbr3p codierenden Nucleinsäure über ihre gesamte Länge hinweg eine sehr große Homologie auf, wobei die Homologie mehr als 75 %, insbesondere mehr als 80 %, vorzugsweise mehr als 85 %, besonders bevorzugt mehr als 90 % und am bevorzugtesten mehr als 95 % oder mehr als 98 % beträgt.
- 15 Das in der erfindungsgemäßen diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene Zellwandprotein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p kann in der Zusammensetzung beispielsweise als Komplex mit anderen Proteinen vorliegen. Bei diesen Proteinen handelt es sich vorzugsweise um solche, die ebenfalls zur Diagnose
- 20 und/oder Therapie von *Candida*-Infektionen eingesetzt werden können.
- Das in der erfindungsgemäßen diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene Protein kann auch ein Fragment eines Wildtyp-Proteins oder ein Derivat eines Wildtyp-Proteins
- 25 sein. Unter einem „Derivat“ wird ein funktionelles Äquivalent oder ein funktioneller Abkömmling des Wildtyp-Proteins verstanden, das/der unter Beibehaltung der Grundstruktur von Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p durch Substitution von Atomen oder Molekülgruppen beziehungs-

weise Molekülresten erhalten wird und/oder dessen Aminosäuresequenz sich an mindestens einer Aminosäureposition vom Wildtyp-Protein unterscheidet.

Die Unterschiede zwischen dem Zellwandprotein-Derivat und dem
5 Wildtyp-Zellwandprotein können auf natürlicherweise auftretenden oder künstlich erzeugten Mutationen, beispielsweise mittels auf dem Fachgebiet bekannter molekularbiologischer Techniken, in den die Derivate codierende Nucleinsäuren beruhen. Die Unterschiede können auch mittels chemischer Verfahren, beispielsweise bei der chemischen Synthese der Protein-Derivate, erzeugt worden sein. Bei
10 Derivaten handelt es sich auch um Fusionsproteine, bei denen am N-Terminus und/oder C-Terminus von Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p funktionelle Domänen eines anderen Proteins enthalten sind. Die erfindungsgemäß verwendeten Derivate von Rbr1p, Rbr2p oder
15 Rbr3p weisen zu den entsprechenden Wildtyp-Zellwandproteinen, insbesondere zu *C. albicans* Rbr1p mit der in SEQ ID Nr. 2 dargestellten Aminosäuresequenz, zu *C. albicans* Rbr2p mit der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz oder zu *C. albicans* Rbr3p mit der in SEQ ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenz, eine Homologie von mindestens 75 %, beispielsweise mindestens 80 %, insbesondere mindestens 85 %, vorzugsweise mindestens 90 %, bevorzugter mindestens 95 % und am bevorzugtesten mindestens 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % auf.
20

Erfindungsgemäß können die in der diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene Protein-Derivate gegenüber dem Wildtyp-Protein eine veränderte Aktivität, eine veränderte Stabilität, eine veränderte Spezifität, ein verändertes Temperatur-, ein verändertes pH-Wert- und/oder Konzentrationsprofil und/oder ein
25

verändertes Effektorenmuster aufweisen. Das erfindungsgemäß verwendete Zellwandprotein-Derivat kann in anderen Konformationen vorkommen und auch andere Untereinheiten beziehungsweise prä- und/oder posttranskriptionale Modifikationen aufweisen.

- 5 Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, dass die diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen einen Antikörper enthalten können, der spezifisch das Zellwandprotein Rbr1p, das Zellwandprotein Rbr2p oder das Zellwandprotein Rbr3p von *C. albicans* oder von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C.*
10 *glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, einer Trichosporon-Art oder einer Blastoschizomyces-Art erkennt und daran bindet und so dessen Nachweis ermöglicht. Bei dem Antikörper kann es sich sowohl um einen monokonalen als auch einen polyclonalen Antikörper handeln. Erfindungsgemäß kann in der diagnostischen oder pharmazeutischen Zusammensetzung auch nur ein Antikörper-Fragment, beispielsweise Fab, F(ab')₂ und Fv enthalten sein.
- 15

In einer weiteren Ausführungsform kann die erfindungsgemäße diagnostische oder pharmazeutische Zusammensetzung einen Antikörper enthalten, der spezifisch einen Antikörper, der gegen Rbr1p von *C. albicans*, gegen Rbr2p von *C. albicans* oder gegen Rbr3p von *C. albicans* gerichtet ist, erkennt und daran bindet und so den Nachweis dieses Antikörpers, beispielsweise in einer biologischen Probe wie Blut ermöglicht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei
25 der pharmazeutischen Zusammensetzung um einen Impfstoff, der mindestens ein pilzliches Zellwandprotein, insbesondere das Zellwandprotein Rbr1p von *C. albicans* mit der in SEQ ID Nr. 2 darge-

stellten Aminosäuresequenz, das Zellwandprotein Rbr2p von *C. albicans* mit der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz und/oder das Zellwandprotein Rbr3p von *C. albicans* mit der in SEQ ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenz, enthält und der zur aktiven Immunisierung eines menschlichen oder tierischen Körpers gegen eine *Candida*-Infektion geeignet ist. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „aktiven Immunisierung“ eine parentarale Gabe von nicht vermehrungsfähigen Antigenen verstanden, wobei das Ziel darin besteht, im menschlichen oder tierischen Körper einen Antikörper gegen das Antigen und somit gegen den Mikroorganismus, von dem das Antigen stammt, zu bilden. Bei einer aktiven Immunisierung kann es sich auch um eine lokale Gabe, insbesondere orale, nasale oder kutane Verabreichung oder Inhalation, von nicht-vermehrungsfähigen mikrobiellen Antigenen handeln, wobei das Ziel darin besteht, eine lokale Infektabwehr an Schleimhäuten durch Bildung sekretorischer Antikörper und durch Erhöhung der Makrophagenaktivität aufzubauen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der pharmazeutischen Zusammensetzung um einen Impfstoff, der mindestens einen Antikörper ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Antikörper, der Rbr1p von *Candida* spezifisch erkennt und daran bindet, einem Antikörper, der Rbr2p von *Candida* spezifisch erkennt und daran bindet enthält, und einem Antikörper, der Rbr3p von *Candida* spezifisch erkennt und daran bindet, enthält und der zur passiven Immunisierung eines menschlichen oder tierischen Körpers gegen eine *Candida*-Infektion geeignet ist. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „passiven Immunisierung“ die Einspritzung von Immunglobulin-Präparaten, also spezifischen Antikörpern, oder Serum eines aktiv immunisierten Menschen

beziehungsweise Tieres verstanden, wobei das Ziel darin besteht, antiinfektiöse oder antitoxische Antikörper in einen menschlichen oder tierischen Körper zur Vorbeugung oder Behandlung von Infektionskrankheiten zu übertragen.

- 5 Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass der Impfstoff als Lyophilisat oder als wässrige kolloidale Lösung oder Suspension vorliegt. Der erfindungsgemäße Impfstoff kann zusätzlich mindestens ein Adjuvant enthalten.

Die Erfindung betrifft ebenfalls einen Kit zur Identifizierung des Zellwandproteins Rbr1 von *Candida*-Arten oder eines mit *Candida* verwandten pathogenen Organismus und/oder zum Nachweis der Virulenz von *Candida*-Zellen oder von Zellen eines Organismus, der mit *Candida* verwandt ist, umfassend mindestens einen Behälter mit einem Antikörper, der Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p oder ein Fragment davon spezifisch erkennt und daran bindet. In bevorzugter Ausführungsform kann der Kit zur in vitro-Identifizierung von Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p und/oder zum in vitro-Nachweis der Virulenz von *Candida*-Zellen eingesetzt werden. Der Kit kann gegebenenfalls einen zweiten Behälter mit dem isolierten und gereinigten Zellwandprotein 15 Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p von *C. albicans* umfassen. Das isolierte und gereinigte Zellwandprotein Rbr1p oder Rbr2p oder Rbr3p dient vor allem als Kontrolle.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls, eines erfindungsgemäßen Nucleinsäure-Fragmentes, eines erfindungsgemäßen Vektors, einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, eines erfindungsgemäßen Zellwandproteins oder eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur

Diagnose von Krankheiten eines menschlichen oder tierischen Organismus, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls, eines erfindungsgemäßen Nucleinsäure-Fragmentes, eines erfindungsgemäßen Vektors, einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, eines erfindungsgemäßen Proteins oder eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur Herstellung einer diagnostischen Zusammensetzung zur Diagnose von Krankheiten eines menschlichen oder tierischen Organismus, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ebenfalls die Verwendung eines Agens, das die Expression und/oder Aktivität von Rbr1, Rbr2p, Rbr3p und/oder eines homologen Proteins davon vermindert oder hemmt, als Wirkstoff zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten eines menschlichen oder tierischen Organismus, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines Agens, dass die Expression und/oder Aktivität von Rbr1p, Rbr2p, Rbr3p und/oder eines homologen Proteins davon vermindert oder hemmt, als Wirkstoff zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, die durch *Candida*-Arten oder damit verwandte pathogene pilzliche Organismen verursacht werden. Erfindungsgemäß ist das Agens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, den erfindungsgemäßen

Nucleinsäure-Fragmenten, den erfindungsgemäßen Vektoren, den erfindungsgemäßen Wirtszellen, den erfindungsgemäßen Proteinen, den erfindungsgemäßen Antikörpern oder den Substanzen, bei denen mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Identifizieren
5 von therapeutisch wirksamen Substanzen nachgewiesen wurde, dass sie sich als Therapeutikum zur Behandlung von durch *Candida* verursachten Krankheiten eignen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls, eines erfindungsgemäß-
10 ßen Nucleinsäure-Fragmentes, eines erfindungsgemäßigen Vektors, einer erfindungsgemäßigen Wirtszelle, eines erfindungsgemäßigen Pro- teins oder eines erfindungsgemäßigen Antikörpers zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von Substanzen, die die Expression oder Aktivität von Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p in einem pathogenen
15 pilzlichen Organismus hemmen und als Wirkstoff zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorlie- gende Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßigen Nuclein- säuremoleküls mit einer der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ
20 ID Nr. 5 dargestellten Nucleotidsequenz, eines Nucleinsäuremole- küls mit einer Nucleotidsequenz, die ein Protein mit einer der in SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4 oder SEQ ID Nr. 6 dargestellten Aminosäure- sequenzen codiert, oder eines Fragmentes eines dieser Nucleinsäu- remoleküle zur Isolierung einer homologen Nucleinsäure, die das
25 Rbr1p-Protein, das Rbr2p-Protein oder das Rbr3p-Protein von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, einer Trichosporon-Art, einer Blastoschi-

zomyces-Art oder eines anderen pilzlichen pathogenen Organismus codiert.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines erfindungsge-mäßen Antikörpers zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis
5 des virulenten Hyphenstadiums von *Candida*-Zellen.

Die Erfindung wird durch das folgende Sequenzprotokoll, die folgen-den Figuren und folgenden Beispiele näher erläutert.

Das Sequenzprotokoll ist Teil der Beschreibung und enthält die in den SEQ ID Nr. 1 bis 6 dargestellten Sequenzen.

10 SEQ ID Nr. 1 zeigt eine 336 Nucleotide umfassende Nucleinsäure-sequenz, die die in SEQ ID Nr. 2 dargestellte Aminosäuresequenz des Zellwandproteins Rbr1p von *Candida albicans* codiert.

SEQ ID Nr. 2 zeigt die 111 Aminosäurereste umfassende Aminosäu-resequenz des Zellwandproteins Rbr1p von *Candida albicans*.

15 SEQ ID Nr. 3 zeigt eine 507 Nucleotide umfassende Nucleinsäure-sequenz, die die in SEQ ID Nr. 4 dargestellte Aminosäuresequenz des Zellwandproteins Rbr2p von *Candida albicans* codiert.

SEQ ID Nr. 4 zeigt die 168 Aminosäurereste umfassende Aminosäu-resequenz des Zellwandproteins Rbr2p von *Candida albicans*.

20 SEQ ID Nr. 5 zeigt eine 1682 Nucleotide umfassende Nucleinsäure-sequenz, die die Aminosäuresequenz des Zellwandproteins Rbr3p von *Candida albicans* codiert, wobei ein Teil der Aminosäurese-quenz in SEQ ID Nr. 6 dargestellt ist.

SEQ ID Nr. 6 zeigt einen 560 Aminosäureresten umfassenden Teilbereich der Aminosäuresequenz des Zellwandproteins Rbr3p von *Candida albicans*:

Die Figuren zeigen:

- 5 Figur 1 zeigt, dass der Transkriptionsfaktor Rim101p Zellwandgene von *C. albicans* aktiviert oder reprimiert. 1a) Aktivierung hyphaler Gene durch *RIM101*. 1b) Repression von *RBR1*, *RBR2* und *RBR3*, durch *RIM101*. RNA für die Northern-Blot-Analyse wurde aus dem Wildtypstamm SC1453, dem Stamm *RIM101-1426* und *Δrim101*-
10 Mutantenstamm, die jeweils 6 Stunden in YPD-Medium mit 100 mM HEPES-Puffer bei 30°C gezüchtet worden waren, gewonnen. Im Falle von SC1453 und des Mutantenstamms *Δrim101* (dunkle Balken) wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Bei SC1453 und *RIM101-1426* (heller Balken) wurde ein pH-Wert von 4,5 eingestellt. Die
15 quantitative Bestimmung der mRNA-Konzentrationen erfolgte durch Normalisierung der Hybridisierungssignale gegen das *ACT1*-Signal von SC5314 bei einem pH-Wert von 7,4.

Figur 2 zeigt den vom pH-Wert abhängigen Filamentations-Defekt von *Δrbr1*-Mutanten auf M-199 Weichagar. Die Stämme wurden in
20 SC-ura-Medium 24 Stunden vorkultiviert und durch eine kurze Zentrifugation pelletiert. 5 µl konzentrierte Zellsuspension wurden auf die Agar-Oberfläche aufgetragen. Die Platten wurden 72 h bei 30°C inkubiert.

Figur 3 zeigt, dass die *RBR1*-Expression durch *NRG1* aktiviert wird.
25 Die Transkript-Mengen von *RBR1* in Wildtyp-, *Δefg1*-, *Δnrg1*- und *Δtup1*-Mutantenstämmen wurden mittels Northern-Blotting bestimmt. RNA, die aus Stämmen gewonnen wurde, die in α-MEM-Medium 4h

bei einem pH-Wert von 4,5 (Laufspuren 1-4) oder einem pH-Wert von 7,4 (Laufspuren 5-8) bei nicht-induzierenden Temperaturen von 25°C oder bei Hyphen-induzierenden Temperaturen von 37°C kultiviert worden waren. rRNA*: Ethidiumbromid-gefärbte Kontrolle.

- 5 Figur 4 (a) zeigt, dass die Expression von *RBR1* und *NRG1* von *RIM101* und von der Temperatur abhängig ist. Die Stämme SC1453, *RIM101-1426* und *Δrim101* wurden 6 h in α-MEM-Medium, 100 mM-HEPES-Puffer bei einem pH-Wert von 4,5 und einem pH-Wert von 7,4 bei 25°C und 37°C kultiviert, um RNA zur Northern-Blot-
10 Analyse zu isolieren. rRNA*: Ethidiumbromid-gefärbte Kontrolle.

Figur 5 zeigt die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen *Candida*-Stämmen in einem Maus-Modell für systemische Candidose erhalten wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass Rbr1p für die Virulenz von *Candida* und für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes durch Candi-
da notwendig ist.
15

Beispiel

Materialien und Verfahren

***C. albicans*-Stämme**

Die verwendeten *C. albicans*-Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

- 20 Die DNA-Microarray-Experimente wurden mit drei unterschiedlichen Stämmen durchgeführt:
a) dem Wildtyp-Stamm (SC5314),

- b) dem homozygoten Deletionsstamm $\Delta rim101$ (CAF3- x *ura3::imm434/ura3::imm434 rim101::hisG/rim101::hisG::URA3*) (El Barkani et al., Mol. Cell Biol., 20 (2000), 4635-4647) und
- 5 c) dem Stamm *RIM101-1426* (CAF3-16-2 *ura3::imm434 /ura3::imm434 RIM101/RIM101-(pBSK+ -RIM101-1426-URA3)_{n>2}*) der das dominante aktive Protein Rim101-1426p überexprimiert (El Barkani et al., 2000).

Die *RBR1*-Deletions-Mutanten wurden durch schrittweise homologe Rekombination von CA14 unter Verwendung einer *URA3*-Flipper-
10 Cassette (Morschhauser et al., Mol. Microbiol., 32 (1999), 547-556) konstruiert. Ein inneres und ein äußeres Paar von Sequenzen, die die codierende Sequenz von *RBR1* flankieren, wurden mittels PCR amplifiziert. Das äußere Paar der flankierenden Bereiche (FR1 und FR2) wurde zur Deletion des ersten Allels verwendet. Die inneren
15 flankierenden Bereiche (FR3 und FR4) wurden zur Deletion des zweiten *RBR1*-Allels verwendet. Die folgenden Primerpaare wurden zur Amplifikation der äußeren und inneren flankierenden Bereiche mittels PCR in einer Peltier Thermal Cycler 200-Vorrichtung (MJ Research) mit 30 Zyklen bei 55°C verwendet:

- 20 1) FR1.for: 5'-AAGGGCCCCACAAAATAAAAGCAGCAGGAA und
FR1.rev: 5'-CCGCTCGAGTTCCAACTTAATCCCGCAC (Produkt-
länge 457 bp);
2) FR2.for: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTGCCACCAGTCAAATT
CAA und

FR2.rev: 5'-CGAGCTCCGAAATGCCACCATAGTTT (Produktlänge 527 bp);

3) FR3.for: 5'-AAGGGCCC GTGC GGGATTAAAGTTGGAA und

FR3.rev: 5'-CCGCTCGAGTTGTTGTTGTAAGCGAAGCC (Produktlänge 563 bp);

4) FR4.for: 5'-ATAAGAACGCGCCGCTGAATGAGAATGAGG GGGAC und

FR4.rev: 5'-CGAGCTCTTGAATTTGACTGGTGGCAA (Produktlänge 565 bp).

10 Die Primersequenzen enthielten unikale Schnittstellen (in den Sequenzen unterstrichen), um eine direkte Ligierung der flankierenden Bereiche in das Plasmid pSFU1 (Morschhauser et al., 1999) zu ermöglichen. FR1 und FR3 wurden in den Vektor nach Spaltung mit den Restriktasen *Apal* und *Xhol* zu ligieren. FR2 und FR4 wurden 15 nach Spaltung mit *NotI* und *SacI* insertiert, wobei die Plasmide pSFUR1-2 für das Konstrukt mit der äußeren Deletion und pSFUR1-4 für das Konstrukt mit der inneren Deletion erhalten wurden. Zur Reversion der homozygoten $\Delta rbr1$ -Stämme wurden die codierende Sequenz und der Promotorbereich von *RBR1* in den integrativen *C. albicans*-Expressionsvektor pCaExp (Care et al., Mol. Microbiol., 34 20 (1999), 792-798) cloniert, wobei die Primer:

2736f-1.FR1.for: AAGGGCCCCACAAAATAAAAGCAGCAGGAA und

RBR1.RVT.rev: CCGCTCGAGCCGAAATGCCACCATAGTTT

verwendet wurden.

Der Vektor enthielt das *URA3*-Gen unter der Kontrolle des nativen Promotors und wurde zur Integration in den *RP10*-Locus entworfen.

Drei unabhängige $\Delta rbr1$ -Mutantenstämme wurden mit pCaExp beziehungsweise pCaExp-*RBR1* transformiert. Transformanten, die 5 *URA3* exprimierten, wurden auf synthetischem vollständigem Medium ohne Uridin (SC-uri) selektiert. Einzelkolonien wurden abgenommen und 6 h in SC-uri-Medium bei 30°C kultiviert und anschließend wurde die Rekombination des *RBR1*-Locus mittels Southern-Blot-Analyse bestätigt. Zur Bestimmung der mRNA-Konzentration 10 mittels Northern-Blot-Experimenten wurden die Stämme bei 30°C in α -MEM-Medium (pH-Wert 4,5) kultiviert.

Medien- und Wachstumsbedingungen

Alle verwendeten Medien enthielten Endkonzentrationen von 100 mM HEPES-Puffer und 0,1 mM Uridin. Die gewünschten pH-Werte 15 wurden entweder mit 1 M NaOH (pH 7,4) oder 1 M HCl (pH 4,5) vor Sterilfiltration eingestellt. Für DNA-Microarray-Experimente wurden Zellen aus Kulturen, die über Nacht bei 30°C in YPD-Medium inkubiert worden waren, pelletiert, dekandiert und im restlichen Medium resuspendiert. Vorgewärmte Medien mit einem gleichen pH-Wert 20 wurden mit der Zellsuspension bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ = 0,05 beimpft. Die *Δrim101*-Mutante und der Wildtyp-Kontrollstamm wurden bei einem pH-Wert von 4,5 kultiviert. Um einen Vergleich mit der *RIM101-1426*-Mutante und dem Wildtyp-Stamm zu ermöglichen, wurden beide Stämme auch bei einem pH-Wert von 7,4 kultiviert. 25 Zur Vermeidung unerwünschter Effekte aufgrund signifikanter Veränderungen des pH-Wertes wurde der pH-Wert am Ende jedes Experimentes bestimmt. Die Veränderungen des pH-Wertes betrugen

nicht mehr als 0,2 pH-Einheiten. Wenn Northern-Blot-Experimente zur Bestätigung der DNA-Microarray-Daten durchgeführt wurden, wurden die Stämme unter identischen Bedingungen kultiviert.

Northern-Blot-Experimente und phänotypische Untersuchungen wurden in YPD-Medium, α-MEM-Medium (GIBCO), enthaltend 2 % Glucose, oder Gewebekulturmedium M-199 (GIBCO) mit 0,1 mM Uridin und 101 mM HEPES durchgeführt. Die Stämme wurden bei 25°C, 29°C, 30°C oder 37°C bei sauren und neutralen pH-Werten kultiviert. Festmedien enthielten entweder 2 % Agar oder 0,3 % Agar für Weichagar-Platten, wobei eine 4 %ige erhitzte Agarlösung den vorher erwärmteten Medien zugegeben wurde.

C. albicans-zellwandspezifischer DNA-Microarray

Der zellwandspezifische DNA-Microarray wurde von Sohn et al. (Mol. Microbiol., 47 (2003), 89-102) beschrieben. Der Array enthält 117 verschiedene Sonden für bekannte Gene und bislang noch nicht charakterisierte offene Leserahmen von *C. albicans*. 65 dieser Gene sind Homologe von Zellwandprotein-codierende Genen von *S. cerevisiae*. Der Array erfasst ferner Gene, die Proteine codieren, von denen bereits bekannt ist, dass diese in der Zellwand von *C. albicans* lokalisiert sind. Zur Kontrolle wurden Sonden für Actin (*ACT1* (X16377)) einbezogen.

Sonden-Amplifikation und Herstellung von DNA-Microarrays

Die Sonden wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *C. albicans* in einem Volumen von 100 µl auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mittels einer Peltier Thermal Cycler 200-Vorrichtung (MJ Research) amplifiziert. Die PCR wurde in PCR-Puffer (100 mM Tris-

HCl, pH 8,8, 600 mM KCl, 15 mM Mg₂Cl), enthaltend 1 M Betain (Sigma), 0,3 µm Cresolrot (Sigma) durchgeführt. Eine Einheit Taq-Polymerase, 20 ng Template und jeweils 0,25 µm jedes Primers und 0,2 mM jedes dNTPs wurden hinzugegeben und anschließend wurden 5 den 30 PCR-Zyklen durchgeführt, wobei die Denaturierung bei 94°C, die Anlagerungsreaktion bei 50°C und die Verlängerungsreaktion bei 72°C über jeweils 1 Minute durchgeführt wurden. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in 1 %igen Agarose-Gelen analysiert. Bevor die Sonden auf Polylysin-beschichtete Glas-Objektträger 10 aufgetragen wurden, wurde die Flüssigkeit die Nacht über bei 8°C verdampft, sodass eine Endkonzentration von Betain von 1,5 bis 2 M erhalten wurde.

Zur Herstellung der DNA-Microarrays wurden Glasobjektträger (J. Melvin Freed Brand, Sigma) 2 h in 2,5 M NaOH in 60 % EtOH auf 15 einer Schüttelvorrichtung gewaschen. Die Objektträger wurden fünfmal in frischem ddH₂O gespült und durch einstündige Inkubation in 0,01 % Polylysin (Sigma) in 0,1 x PBS mit Polylysin beschichtet. Danach wurden die Objektträger kurz in ddH₂O gewaschen und mittels Zentrifugation getrocknet, wobei anschließend eine 30-minütige Behandlung bei 50°C erfolgte. Die PCR-Sonden wurden auf die beschichteten Objektträger mittels einer GMS417-Microarray-Vorrichtung aufgedruckt (Genetic Microsystems). Zur Nachbehandlung wurden die Arrays 5-10 min über 2 x SSC rehydriert und 2 s auf einem Umkehr-Hitzeblock bei 80°C getrocknet. Die DNA wurde mittels UV-Licht mit 65 mJ in einer Stratalinker-Vorrichtung (Stratagene) 20 vernetzt. Die Objektträger wurden 20 min in Blockierungslösung (170 mM Bernsteinsäureanhydrid, 70 mM Natriumborat, pH 8,0, in 1-Methyl-2-pyrrolidinon) inkubiert und danach 2 min in kochendem 25

ddH₂O gewaschen. Nach einem kurzen Spülen in 95 % EtOH wurden die Objektträger mittels Zentrifugation getrocknet.

Isolierung von RNA, Fluoreszenzmarkierung von cDNA und Hybridisierung auf den Objektträgern

- 5 Nach einer 6-stündigen Zell-Kultivierung wurde die optische Dichte bestimmt und die Zellen wurden mittels einer kurzen Zentrifugation bei 1700 x g geerntet. Erhaltene Zellpellets wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und der pH-Wert des Überstandes wurde bestimmt. Gesamt-RNA wurde mittels eines Verfahrens unter Verwendung von saurem Phenol isoliert: Ein Volumen saures Phenol (Roth) und ein Volumen TES (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS) wurden den gefrorenen Zellpellets zugegeben und anschließend erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 65°C unter gelegentlicher Vortex-Behandlung. Anschließend wurden eine weitere Phenol-Extraktion über 10 min bei 65°C und schließlich eine Chloroform-Extraktion bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde die RNA mit 0,3 M NaAc in 70 % EtOH präzipitiert. Bei RNA, die zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde, wurde routinemäßig eine Präzipitation in 2 M LiCl durchgeführt.
- 10
- 15
- 20 Fluoreszenz-markierte cDNA zur Microarray-Hybridisierung wurde durch reverse Transkription von 30 µg RNA mit Superscript II (Invitrogen) erhalten. Danach erfolgte eine Markierung unter Verwendung eines Standard-Markierungsprotokolls, wobei entweder cy3-dUTP oder cy5-dUTP (Amersham) eingesetzt wurden. Markierte cDNA wurde mit einer Kontroll-cDNA, die mit einer anderen Markierung versehen war, gemischt, mit TE-Puffer, pH-Wert 7,4, gewaschen, aufgereinigt und auf ein Endvolumen von 12 bis 15 µl in 4 x
- 25

SSC und 0,2 % SDS unter Verwendung von Microcon YM-30-Filtern (Millipore) eingestellt. Eine Hybridisierung auf dem Array wurde unter einem Deckgläschen bei 63°C die Nacht über in einem Wasserbad durchgeführt. Nach Hybridisierung wurden die Deckgläschen und die
5 ungebundene cDNA durch schrittweises Waschen mit 1 x SSC/0,03 % SDC, 0,2 x SSC und 0,05 x SSC entfernt. Die Chips wurden mittels Zentrifugation getrocknet und sofort gescannt.

Analyse der DNA-Microarray-Daten

Die DNA-Microarrays wurden mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie
10 unter Verwendung eines GMS 418-Array-Scanners (Genetic Microsystems) gescannt. Zur Photo-Excitation wurden die folgenden Wellenlängen eingesetzt: 532 nm für Cy3-markierte cDNA und 635 nm für Cy5-markierte cDNA. Fluoreszenz-Spot-Signale von 16 bit-TIFF-Bilder in den Cy3- und Cy5-Kanälen wurden überlagert und unter
15 Verwendung der ImaGene-Software Version 3,0 (Bio Discovery, Los Angeles, USA) quantifiziert. Die Spots wurden als Mittelwert aller Pixel-Werte im Spot-Bereich quantifiziert. Der Hintergrund wurde für jeden Spot separat als Mittelwert aller Pixel-Werte im Hintergrundsbereich quantifiziert. Die Hintergrundswerte wurden von den entsprechenden Spot-Werten subtrahiert, wobei Netto-Signal-Werte
20 erhalten wurden. Die Netto-Signal-Werte unter „1“ wurden als „1“ bewertet. Sonden mit Netto-Signal-Werten unter „1000“ für beide Kanäle wurden bei der Berechnung unter den entsprechenden Bedingungen nicht berücksichtigt. Eine unterschiedliche Transkription
25 wurde als Verhältnis der Signalwerte beider Kanäle angegeben. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte von zwei Werten aus mindestens drei verschiedenen Experimenten. Die DNA-Mikroarray-Daten wurden größtenteils mittels Northern-Blot-Analyse unter iden-

tischen Bedingungen bestätigt (vergleiche Stämme und Wachstumsbedingungen).

Northern-Hybridisierung

15 µg Gesamt-RNA wurden mittels Elektrophorese auf denaturierenden Gelen (1 % Agarose, 0,02 M MOPS, 8 mM NaAc, 1 mM EDTA und 2,2 M Formaldehyd) getrennt. RNA wurde auf Hybond-N (Amersham)-Nylon-Membranen unter Verwendung von 20 x SSC entsprechend Standard-Protokollen (Sambrook, 1989) aufgetragen und an die feuchten Blots zweimal mit 120 mJ in einer Stratalinker-
10 Vorrichtung (Stratagene) UV-vernetzt. Die Blots wurden entweder 1 h bei 65°C vorhybridisiert oder bei -80°C eingefroren, bevor sie weiterverarbeitet wurden. Die PCR-amplifizierten Sonden wurden aufgereinigt und anschließend unter Verwendung von [α -³²P]dCTP und Zufallsprimern (Stratagene) mittels einer Klenow-Reaktion markiert.
15 Die Hybridisierung mit Einzelsonden erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 6 h. Anschließend erfolgten drei Waschschritte in 1 % SSC, 0,1 % SDS. Die Blots wurden unter Verwendung eines Phosphor-Screen (Molecular Dynamics) über einen Zeitraum von 24 bis 72 h entwickelt. Die Screens wurden unter Verwendung einer
20 Phosphor-Imager-Vorrichtung (Molecular Dynamics) gescannt. Einzelbanden wurden unter Verwendung von ImageQuant 5,2 (Molecular Dynamics) quantitativ erfasst. Die Signale wurden entweder nach Normalisierung bezüglich Actin-mRNA-Mengen oder anhand von Ethidiumbromid-gefärbten 18s- und 28s-rRNA-Banden quantifiziert.

25 Isolierung chromosomaler DNA und Southern-Hybridisierung

Chromosomal DNA von *C. albicans* wurde isoliert wie beschrieben (Millon et al., J. Clin. Microbiol., 32 (1994), 1115-1118), mit EcoRI

beziehungsweise *PstI* gespalten und auf 0,8 % Agarose-Gelen getrennt. Das Auftragen auf Nylon-Membranen in 20 x SSC und die Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde, die nach dem Zufallsprinzip mit [α -³²P] dCTP markiert worden war, erfolgte gemäß

5 Standardprotokollen (Sambrook, 1989). Die Membranen wurden unter Verwendung eines Phosphor-Screens (Molecular Dynamics) 12 h entwickelt. Anschließend wurden sie gescannt und wie für die Northern-Hybridisierung beschrieben, visualisiert.

Ergebnisse

10 Die DNA-Microarray-Analyse führt zur Identifizierung neuer, durch *RIM101* regulierter Zellwandgene im *C. albicans*

Die Zellwand von *C. albicans* schützt den Pilz vor seiner Umwelt und ist von zentraler Bedeutung für die Wirt-Pathogen-Wechselwirkung. Es ist bekannt, dass der pH-abhängige Transkriptionsfaktor *RIM101* 15 zwei Glycosidasen reguliert, die an der Zellwand-Biosynthese von *C. albicans* beteiligt sind (Muhschlegel und Fonzi, Mol. Cell. Biol., 17 (1997), 5960-5967). Zur Identifizierung weiterer von *RIM101* regulierter Zellwand-Gene wurde eine Transkriptionsanalyse unter Verwendung eines zellwallspezifischen DNA-Microarrays durchgeführt. Die 20 Chip-Experimente wurden unter Verwendung eines *Δrim101*-Mutantenstammes und des Stammes *RIM101-1426*, der das C-terminal verkürzte, dominante aktive Protein Rim101-1426p überexprimiert, durchgeführt. Die Mutantenstämme wurden mit Wildtyp-Zellen in YPD-Medium bei einer Temperatur von 30°C und einem 25 pH-Wert von 7,4 beziehungsweise 4,5 verglichen. Zur Erfassung der durch die pH-Veränderungen hervorgerufenen Gen-Regulationsereignisse wurden alle Stämme unter Bedingungen ge-

züchtet, die die Ausbildung einer Blastosporen-Morphologie favorisieren. Keiner der Stämme zeigte daher filamentöses Wachstum, wenn die Zellen zur RNA-Isolierung nach sechsstündiger Kultivierung geerntet wurden.

5 Die Gene *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* werden durch Rim101p reprimiert

Die erhaltenen Daten zeigen, dass mehrere bislang nicht charakterisierte offene Laserraster durch Rim101p reprimiert werden, wozu *RBR1* (orf6.6747), *RBR2* (orf6.6744) und *RBR3* (orf6.1159) gehören. Zur Bestätigung der Microarray-Daten und zur Quantifizierung der
10 Transkription dieser Gene wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Figur 1b gezeigt. *RBR1*, *RBR2* und *RBR3* wurden Säure-exprimiert, wobei bei einem neutralen pH-Wert keine signifikante Expression im Wildtyp nachgewiesen wurde. Die *RBR*-Gene wurden durch dominant aktives *RIM101-1426* bei einem
15 sauren pH-Wert reprimiert und unter allen Bedingungen in Δ *rim101*-Mutantenstämmen stark hochreguliert (siehe Figuren 1b und Figur 4). Gemäß einer *in silico*-Untersuchung weisen alle drei *RIM101*-reprimierten Gene eine etwa 20 Aminosäure umfassende N-terminale Signalsequenz zum Transport in das endoplasmatische
20 Retikulum und eine C-terminale hydrophobe Transmembran-Domäne auf. Alle RBR-Proteinsequenzen umfassen ebenfalls eine hydrophobe N-terminale Domäne. Die Transmembran-Domänen sind charakteristisch für GPI-verankerte Zellwandproteine. Den Transmembran-Domänen schließt sich eine stromaufwärts gelegene
25 Sequenz mit einer Omega-Stelle an, die die Spaltstelle zur Anlagerung des GPI-Ankers definiert ebenso wie weitere Determinanten, die die Lokalisierung entweder in der Zellwand oder in der Plasmamembran definieren (Caro et al., Yeast, 13 (1997), 1477-1489; De

- Groot et al., Yeast, 20 (2003), 781-796; Frieman und Cormack, Mol. Microbiol., 50 (2003), 883-896). Die Proteine Rbr1p (111 Aminosäuren) und Rbr2p (168 Aminosäuren) besitzen potentielle Spaltstellen an den Positionen 81 beziehungsweise 143. Das Protein Rbr3p (560 Aminosäuren) zeigt eine potentielle Spaltstelle an Position 540. Darüber hinaus zeigt die Proteinsequenz mit Ausnahme der C- und N-terminalen hydrophoben Sequenzen mehrere Stellen mit einem hohen O-beta-Glycosylierungs-Potential, das typisch für pilzliche Zellwandproteine ist (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>).
- 10 Eine Recherche von pro- und eukaryotischen Genom-Datenbanken am National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) zeigte, dass die erfindungsgemäßen RBR-Gene keine signifikante Homologie zu Genen von *S. cerevisiae* oder anderen Organismen zeigen. Es zeigte sich, dass 15 Rbr1p etwa 40 % identisch mit Hyr1p von *C. albicans*, einem GPI-verankerten, nicht-essentiellen Zellwandprotein ist, das sehr häufig in Hyphen vorkommt (Bailey et al., J. Bacteriol., 178 (1996), 5353-5360).

Der Δrbr1-Mutantenstamm zeigt einen pH-abhängigen Filamentations-Defekt

Da *RBR1* gegenüber den anderen *RIM101*-reprimierten Genen die stärkste Expression zeigte, wurde dieses Gen näher charakterisiert. Das offene Laserraster (orf6.6747), das Rbr1p codiert, hat eine Länge von 336 bp und codiert ein GPI-verankertes Protein von nur 111 Aminosäuren. Zur funktionellen Charakterisierung des Zellwandproteins Rbr1p in *C. albicans* wurden drei unabhängige Δrbr1-Mutantenstämme mittels Transformation und homologer Rekombina-

tion von CA14 unter Verwendung der *URA3*-Flipper-Kassette (Morschhauser et al., 1999) konstruiert. Die Stämme wurden routinemäßig zuerst auf SC-uri-Medium selektiert und in einem zweiten Schritt nach Induktion der FLP-Rekombinase auf *ura3*-Kolonien.

5 Homozygote $\Delta rbr1$ -Mutanten wurden entweder nur mit dem *URA3*-Gen oder mit *URA3* und *RBR1* unter der Kontrolle von dessen nativem Promotor revertiert. Heterozygote und homozygote $\Delta rbr1$ -Mutanten zeigten keine Wachstumsdefekte unter den verwendeten Medienbedingungen. Southern- und Northern-Blot-Analysen bestätigten den Genotyp und die *RBR1*-Transkription. Da *RBR1* hauptsächlich bei einem niedrigen pH-Wert exprimiert wird (vergleiche Figur 1b) sind unter diesen Bedingungen mögliche Veränderungen im Wachstum und bei der Resistenz gegen Zellwandstress sowie Filamentationsdefekte zu erwarten. Daher wurde das Wachstum und die 10 Filament-Induktion der $\Delta rbr1$ -Mutanten in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, Calcofluor-white und 0,3 M MaCl auf unterschiedlichen Festmedien bei 25°C, 30°C und 37°C untersucht. Auf Medien mit 2 % Agar wurde kein distinkter Phänotyp beobachtet, wobei jedoch die $\Delta rbr1$ -Stämme auf Weichagar mit 0,3 % Agar einen Filamentations-Defekt zeigten. Bei einer dreitägigen Inkubation auf M- 15 199-Weichagar mit einem pH-Wert von 4,5 zeigte $\Delta rbr1$ kein filamentöses Wachstum (vergleiche Figur 2), während beim Wildtyp und der *RBR1*-Revertante nach 24 Stunden bei 30°C eine Filamentation induziert wurde. Unter den gleichen Bedingungen und bei einem pH-Wert von 7,4 induzierte der $\Delta rbr1$ -Stamm keine Filamente 20 nach 24 Stunden (Daten nicht gezeigt). Dieser Defekt in der Filament-Induktion deutet darauf hin, dass *RBR1* insbesondere in der Zellwand von *C. albicans* in einer sauren Umgebung benötigt wird. Dies stimmt mit dem Expressionsprofil von *RBR1* überein (vergleiche 25

Figur 1b). Nach 5 Tagen auf einem sauren M-199-Weichagar bei 30°C begannen die $\Delta rbr1$ -Mutantenstämme auch Hyphen zu bilden, was möglicherweise auf einen damit nicht im Zusammenhang stehende Nährstoffmangel zurückzuführen ist. Wenn der Test in flüssigen Medien durchgeführt wurde, wurde zwischen dem Wildtyp und der $\Delta rbr1$ -Mutante kein Unterschied im Wachstum oder der Filamentierungsrate festgestellt (Daten nicht gezeigt), was darauf hinweist, dass für den beobachteten Phänotyp oberflächenvermittelten Effekte verantwortlich sein könnten.

10 NRG1 aktiviert die Expression von RBR1

Da Rbr1p am Dimorphismus-Switch beteiligt zu sein scheint, sollte die Frage geklärt werden, ob neben Rim101p auch andere Transkriptionsregulatoren der Morphogenese in *C. albicans* an der *RBR1*-Regulation beteiligt sind. Daher wurde die Expression von 15 *RBR1* in den Mutantenstämmen $\Delta efg1$, $\Delta nrg1$ und $\Delta tup1$ bei einem pH-Wert von 4,5 bei 25°C und einem pH-Wert von 7,4 bei 37°C in Hyphen-induzierenden Medien untersucht (Figur 3). Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von *RBR1* in der Mutante $\Delta nrg1$ bei einem pH-Wert von 4,5 stark reduziert war, während in den Mutanten $\Delta efg1$ und $\Delta tup1$ dem Wildtyp entsprechende Transkript-Mengen nachgewiesen wurden. Bei einem neutralen pH-Wert wurde keine signifikante *RBR1*-Expression festgestellt, weder im Wildtyp noch in einer der getesteten Deletionsmutanten. Diese Daten deuten darauf hin, dass Nrg1p direkt oder indirekt die *RBR1*-Transkription 20 aktiviert, während Efg1p und Tup1p unter den getesteten Bedingungen nicht an der *RBR1*-Regulation beteiligt waren.

-5/-

Tabelle 1: Verwendete *C. albicans*-Stämme

Stamm	Früherer Name	Genotyp	Referenz
Wildtyp	SC5314	Klinisches Isolat	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
CA/4	CA/4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Fonzi & Irwin, 1993)
$\Delta rim101$	CAF3-X	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rim101::hisG/rim101::hisG::URA3</i>	(El Barkani <i>et al.</i> , 2000)
<i>RIM101-1426</i>	CAF3-16-2	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 RIM101/RIM101-(pBSK+ -RIM101-1426-URA3)_{n>2}</i>	(El Barkani <i>et al.</i> , 2000)
$\Delta efg1$	HLC52	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 efg1::hisG/efg1::hisG::URA3</i>	(Lo <i>et al.</i> , 1997)
$\Delta nrg1$	MMX3	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 nrg1::hisG/nrg1::hisG::URA3</i>	(Murad <i>et al.</i> , 2001b)
$\Delta tup1$	BCA2-9	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 tup1::hisG/tup1::hisG::URA3</i>	(Murad <i>et al.</i> , 2001b)
$\Delta br1$	HL12-2	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rbr1::FRT*:rbr1::FRT rpn10::URA3</i>	+
$\Delta rbr1-RBR1$	HL13-6	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 rbr1::FRT/rbr1::FRT rpn10::RBR1- URA3</i>	

* FRT bezeichnet die FLP-Erkennungsstellen, die nach Herausschneiden der URA3-FRT-Flipper-Kassette verbleibt

+ Mutantenstämme wurden 3-mal unabhängig voneinander konstruiert.

Ansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, das ein zur Hyphenentwicklung eines pathogenen pilzlichen Organismus erforderliches Zellwandprotein codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - 5 a) einem Nucleinsäuremolekül mit einer der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleotidsequenzen,
 - 10 b) einem Nucleinsäuremolekül mit einer Nucleotidsequenz, die ein Protein mit einer der in SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4 oder SEQ ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codiert,
 - 15 c) einem Nucleinsäuremolekül mit einer Nucleotidsequenz, die über ihre gesamte Länge eine Homologie von mindestens 80% zu einer Nucleotidsequenz eines der Nucleinsäuremoleküle von a) oder b) zeigt, und
 - 20 d) einem Nucleinsäuremolekül mit einer Nucleotidsequenz, die zu einer Nucleotidsequenz eines der Nucleinsäuremoleküle von a) bis c) komplementär ist.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nucleinsäuremolekül die Sequenz des *RBR1*-Gens von *Candida albicans* aufweist.
3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nucleinsäuremolekül die Sequenz des *RBR2*-Gens von *C. albicans* aufweist.
4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nucleinsäuremolekül die Sequenz des *RBR3*-Gens von *C. albicans* aufweist.

5. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 2, wobei das *RBR1*-Gen ein pH- und/oder Temperatur-reguliertes Gen ist.
6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 2 oder 5, wobei die Expression des *RBR1*-Gens durch den Repressor Nrg1p aktiviert und durch den Transkriptionsfaktor Rim101p reprimiert wird.
7. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Nucleinsäuremolekül als DNA-, RNA-, PNA-, LNA-Molekül oder als Mischform davon vorliegt.
8. Fragment eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass es in einer Wirtszelle in Antisense-Orientierung zu einem Promotor die Expression eines Zellwandproteins eines pathogenen pilzlichen Organismus hemmen kann und mindestens 10 Nucleotide umfasst.
9. Fragment nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass es mindestens 15, insbesondere mindestens 25, vorzugsweise mindestens 50 und besonders bevorzugt mindestens 100 Nucleotide umfasst.
10. Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, dass er mindestens ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder mindestens ein Nucleinsäure-Fragment nach Anspruch 8 oder 9 unter der funktionellen Kontrolle von mindestens einem Expressions-Regulationselement enthält, das die Transkription der Nucleinsäure in eine translatierbare RNA und/oder die Translation der RNA in ein Protein gewährleistet.
- 25 11. Vektor nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Vektor ein Plasmid, Cosmid, Bakteriophage oder Virus ist.

12. Vektor nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Regulationselement ein Promotor, Enhancer, Silencer, 3'-Transkriptionsterminator oder eine Ribosomenbindungsstelle ist.
- 5 13. Vektor nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei der Vektor eine Signalsequenz zum Transport des exprimierten Proteins in eine Zellorganelle, ein Zellkompartiment, in den extrazellulären Raum oder aus der Zelle heraus aufweist.
- 10 14. Vektor nach einem der Ansprüche 10 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Nucleinsäuremolekül oder Fragment davon in Antisense-Orientierung zu dem mindestens einen Regulationselement angeordnet ist.
- 15 15. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie mindestens einen Vektor nach einem der Ansprüche 10 bis 14 enthält.
16. Wirtszelle nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wirtszelle eine pro- oder eukaryotische Zelle ist.
17. Wirtszelle nach Anspruch 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wirtszelle eine Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder Säugerzelle ist.
- 20 18. Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wirtszelle eine *C. albicans*-Zelle ist.
- 25 19. Wirtszelle nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass die *C. albicans*-Zelle einen Vektor enthält, bei dem ein Nucleinsäuremolekül mit einer der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleotidsequenzen oder mit einer Nucleotidsequenz, die ein Protein mit einer der in SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4 oder SEQ ID Nr. 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codiert, in Antisense-Orientierung zu mindestens einem Regulationselement angeordnet ist.

20. Verfahren zur Herstellung eines zur Hyphenentwicklung eines pathogenen pilzlichen Organismus erforderlichen Zellwandproteins, insbesondere des Rbr1p-, Rbr2p- oder Rbr3p-Proteins von *C. albicans*, umfassend die Kultivierung einer Wirtszelle nach einem der 5 Ansprüche 15 bis 18 in einem geeigneten Kulturmedium unter Bedingungen, die eine Expression des Zellwandproteins erlauben, und die Gewinnung des exprimierten Zellwandproteins aus der Zelle oder aus dem Medium.
- 21: Protein, das die in SEQ ID Nr. 2 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist und von der in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird. 10
22. Protein nach Anspruch 21, wobei das Protein das Rbr1p-Protein von *C. albicans* ist.
23. Protein, das die in SEQ ID Nr. 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist und von der in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird. 15
24. Protein nach Anspruch 23, wobei das Protein das Rbr2p-Protein von *C. albicans* ist.
25. Protein, das die in SEQ ID Nr. 6 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist und von der in SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleinsäuresequenz codiert wird. 20
26. Protein nach Anspruch 25, wobei das Protein das Rbr3p-Protein von *C. albicans* ist.
27. Protein nach einem der Ansprüche 21 bis 26, hergestellt nach dem Verfahren gemäß Anspruch 20. 25
28. Antikörper, der spezifisch ein Protein nach einem der Ansprüche 21 bis 27 erkennt und daran bindet.

29. Antikörper nach Anspruch 28, wobei der Antikörper ein monoclonaler oder ein polyclonaler Antikörper ist.
 30. Antikörper, der spezifisch einen Antikörper nach Anspruch 28 oder 29 erkennt und daran bindet.
- 5 31. Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des Hyphenstadiums von *Candida*-Zellen oder Zellen pathogener pilzlicher Organismen; die mit *Candida* verwandt sind, umfassend die Inkubation der Zellen oder Zellfraktionen davon mit einem Mittel zur Identifizierung des Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p,
- 10 10 eines homologen Proteins und/oder eines Fragmentes davon, wobei der Nachweis des Proteins oder eines Fragmentes davon das Vorliegen des virulenten Hyphenstadiums der Zellen anzeigt.
- 15 32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die zu charakterisierenden *Candida*-Zellen Zellen von *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* oder *C. lusitaniae* sind.
- 20 33. Verfahren nach Anspruch 31, wobei die zu charakterisierenden Zellen pathogener pilzlicher Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, Zellen einer *Trichosporon*-Art oder einer *Blastoschizomyces*-Art sind.
- 25 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei die zu charakterisierenden Zellen in einer biologischen Probe vorliegen.
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei die zu charakterisierenden Zellen aus einer biologischen Probe isolierte und angereicherte intakte Zellen sind.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei zur Charakterisierung isolierte Zellfraktionen eingesetzt werden, die durch Zellaufschluss und Fraktionierung von *Candida*-Zellen oder Zellen

von mit *Candida* verwandten Arten erhältlich sind und mindestens eine Zellwand-Fraktion umfassen.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36, wobei das zur Identifizierung des Proteins Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p, eines homologen Proteins davon oder eines Fragmentes davon eingesetzte Mittel ein immunologisches Mittel ist.
5
38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei das immunologische Mittel ein gegen das Protein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichtetes Antiserum, ein gegen das Protein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichteter Antikörper nach Anspruch 28 oder 29 oder ein Fragment davon oder ein Komplex davon ist.
10
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei der Antikörper eine Markierung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Farbmarkierung, einer radioaktiven Markierung, einer Fluoreszenzmarkierung, einer Chemilumineszenz-Markierung oder einem messbaren Reaktion auslösenden Enzym, aufweist.
15
40. Verfahren zum Nachweis einer *Candida*-Infektion und/oder einer Infektion von mit *Candida* verwandten pathogenen Organismen in einer aus einem menschlichen oder tierischen Organismus erhaltenen biologischen Probe, wobei die Gegenwart des Proteins Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p, eines homologen Proteins davon und/oder eines Fragmentes davon in der biologischen Probe und/oder in der Zellwand von gegebenenfalls in der biologischen Probe enthaltenen *Candida*-Zellen oder Zellen von mit *Candida* verwandten pathogenen Organismen nachgewiesen wird, umfassend
20
- a) die Inkubation der biologischen Probe mit einem Mittel zur Identifizierung des Proteins Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p, eines homologen Proteins davon oder eines Fragmentes davon und
25

- b) den Nachweis der Interaktion des Identifizierungsmittels mit dem Protein oder Fragment davon.
41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei die *Candida*-Zellen Zellen von *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* oder *C. lusitaniae* sind.
- 5 42. Verfahren nach Anspruch 40, wobei die Zellen pathogener pilzlicher Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, Zellen einer *Trichosporon*-Art oder einer *Blastoschizomyces*-Art sind.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 42, wobei die biologische Probe ein Haut- oder Schleimhautabstrich, eine Organbiopsie, eine Gewebebiopsie, eine Körperflüssigkeit, ein Körpersekret, Stuhl oder eine Spülung von Hohlräumen oder Hohlorganen ist.
- 10 44. Verfahren nach Anspruch 43, wobei die Körperflüssigkeit Sputum, Urin, Pleuraerguss, Liquor, Lymphe oder Blut ist.
- 15 45. Verfahren nach Anspruch 44, wobei das Blut als ungereinigte Blutprobe, Blutplasma oder Blutserum vorliegt.
46. Verfahren nach Anspruch 44 oder 45, wobei durch den Nachweis des Proteins Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p oder eines Fragments davon in Blut oder in der Zellwand von im Blut enthaltenen *Candida*-Zellen 20 invasive Candidiasis nachgewiesen wird.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 46, wobei das zur Identifizierung des Proteins Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p eingesetzte Mittel ein immunologisches Mittel ist.
- 25 48. Verfahren nach Anspruch 47, wobei das immunologische Mittel ein gegen das Protein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichtetes Antiserum, ein gegen das Protein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p gerichteter An-

tikörper nach Anspruch 28 oder 29 oder ein Fragment davon oder ein Komplex davon ist.

49. Verfahren nach Anspruch 47 oder 48, wobei der Antikörper eine Markierung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Farbmarkierung, einer radioaktiven Markierung, einer Fluoreszenzmarkierung, einer Chemilumineszenz-Markierung oder einem eine messbare Reaktion auslösenden Enzym, aufweist.
5
50. Verfahren zum Auffinden und Identifizieren von Substanzen mit therapeutischer Wirkung gegen Krankheiten, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Arten, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden, wobei eine zu testende Substanz in einem geeigneten Medium mit mindestens einem Agens, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, einem Nucleinsäure-Fragment nach Anspruch 8 oder 9, einem Vektor nach einem der Ansprüche 10 bis 14, einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 19, einem Protein nach einem der Ansprüche 21 bis 27 oder einem Antikörper nach einem der Ansprüche 28 bis 30, in Kontakt gebracht und eine Interaktion zwischen der zu testenden Substanz und dem Agens nachgewiesen wird.
10
15
20
51. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, ein Nucleinsäure-Fragment nach Anspruch 8 oder 9, einen Vektor nach einem der Ansprüche 10 bis 14, eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 19, ein Protein nach einem der Ansprüche 21 bis 27 und/oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 28 bis 30.
25
52. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, ein Nucleinsäure-Fragment nach Anspruch 8 oder 9, einen Vektor nach einem der Ansprüche 10 bis 14, eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 30

- 19, ein Protein nach einem der Ansprüche 21 bis 27, einen Antikörper nach einem der Ansprüche 28 bis 30 und/oder eine Substanz, die mittels des Verfahrens nach Anspruch 50 identifiziert wurde.
53. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 52, wobei
5 es sich um einen Impfstoff handelt, der ein Protein nach einem der Ansprüche 21 bis 27 enthält und der zur aktiven Immunisierung eines menschlichen oder tierischen Körpers gegen eine *Candida*-Infektion geeignet ist.
- 10 54. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 52, wobei
es sich um einen Impfstoff handelt, der einen Antikörper nach Anspruch 28 oder 29 enthält und der zur passiven Immunisierung eines menschlichen oder tierischen Körpers gegen eine *Candida*-Infektion geeignet ist.
- 15 55. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 53 oder 54,
wobei der Impfstoff als Lyophilisat vorliegt.
56. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 53 oder 54,
wobei der Impfstoff als wässrige kolloidale Lösung oder Suspension vorliegt.
- 20 57. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche
53 bis 56, zusätzlich enthaltend mindestens ein Adjuvans.
- 25 58. Kit zur in vitro-Identifizierung des Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p von *Candida*-Arten oder eines mit *Candida* verwandten pathogenen Organismus und/oder zum in vitro-Nachweis der Virulenz von *Candida*-Zellen oder von Zellen eines Organismus, der mit *Candida* verwandt ist, umfassend mindestens einen Behälter mit einem Antikörper, der das Protein Rbr1p, Rbr2p oder Rbr3p oder ein Fragment davon spezifisch erkennt und daran bindet.

59. Kit nach Anspruch 58, umfassend einen zweiten Behälter mit dem isolierten und gereinigten Protein Rbr1p, Rbr2p und/oder Rbr3p von *C. albicans*.
60. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7, eines Nucleinsäure-Fragmentes nach Anspruch 8 oder 9; eines Vektors nach einem der Ansprüche 10 bis 14, einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 19, eines Proteins nach einem der Ansprüche 21 bis 27 oder eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 28 bis 30 zur Diagnose von Krankheiten eines menschlichen oder tierischen Organismus, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden.
61. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7, eines Nucleinsäure-Fragmentes nach Anspruch 8 oder 9, eines Vektors nach einem der Ansprüche 10 bis 14, einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 19, eines Proteins nach einem der Ansprüche 21 bis 27 oder eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 28 bis 30 zur Herstellung einer diagnostischen Zusammensetzung zur Diagnose von Krankheiten eines menschlichen oder tierischen Organismus, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden.
62. Verwendung eines Agens, das die Expression und/oder Aktivität des Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p, Rbr3p und/oder eines homologen Proteins davon vermindert oder hemmt, als Wirkstoff zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten eines menschlichen oder tierischen Organismus, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden.

63. Verwendung eines Agens, das die Expression und/oder Aktivität des Zellwandproteins Rbr1p, Rbr2p, Rbr3p und/oder eines homologen Proteins davon vermindert oder hemmt, als Wirkstoff zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten eines menschlichen oder tierischen Organismus, die durch *Candida*-Arten oder pathogene pilzliche Organismen, die mit *Candida* verwandt sind, verursacht werden.
- 5
64. Verwendung nach Anspruch 62 oder 63, wobei das Agens ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, einem Nucleinsäure-Fragment nach Anspruch 8 oder 9, einem Vektor nach einem der Ansprüche 10 bis 14, einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 19, einem Protein nach einem der Ansprüche 21 bis 27, einem Antikörper nach einem der Ansprüche 28 bis 30 oder einer Substanz, die mittels des Verfahrens nach Anspruch 50 identifiziert wurde.
- 10
- 15
65. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7, eines Nucleinsäure-Fragmentes nach Anspruch 8 oder 9, eines Vektors nach einem der Ansprüche 10 bis 14, einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 15 bis 19, eines Proteins nach einem der Ansprüche 21 bis 27 oder eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 28 bis 30 zur Identifizierung und/oder zum Nachweis von Substanzen, die die Expression oder Aktivität des Rbr1p-Proteins in einem pathogenen pilzlichen Organismus hemmen und als Wirkstoff zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Bekämpfung von durch *Candida*-Arten verursachten Erkrankungen geeignet sind.
- 20
- 25
66. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls mit einer der in SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 5 dargestellten Nucleotidsequenzen, eines Nucleinsäuremoleküls mit einer Nucleotidsequenz, die ein Protein mit einer der in SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4 oder SEQ
- 30

- ID Nr.6 dargestellten Aminosäuresequenzen codiert, oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer homologen Nucleinsäure, die das Rbr1p-Protein, das Rbr2p-Protein oder Rbr3p-Protein von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, einer *Trichosporon*-Art, einer *Blastoschizomyces*-Art oder eines anderen pilzlichen pathogenen Organismus codiert.
- 5
67. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 28 oder 29 zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis des virulenten
- 10 Hyphenstadiums von *Candida*-Zellen.

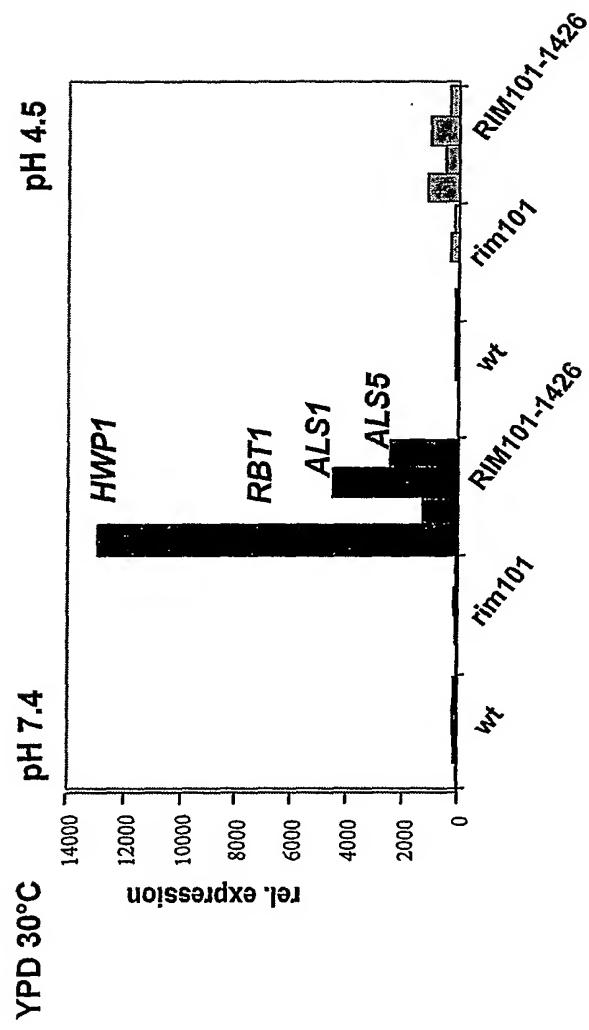
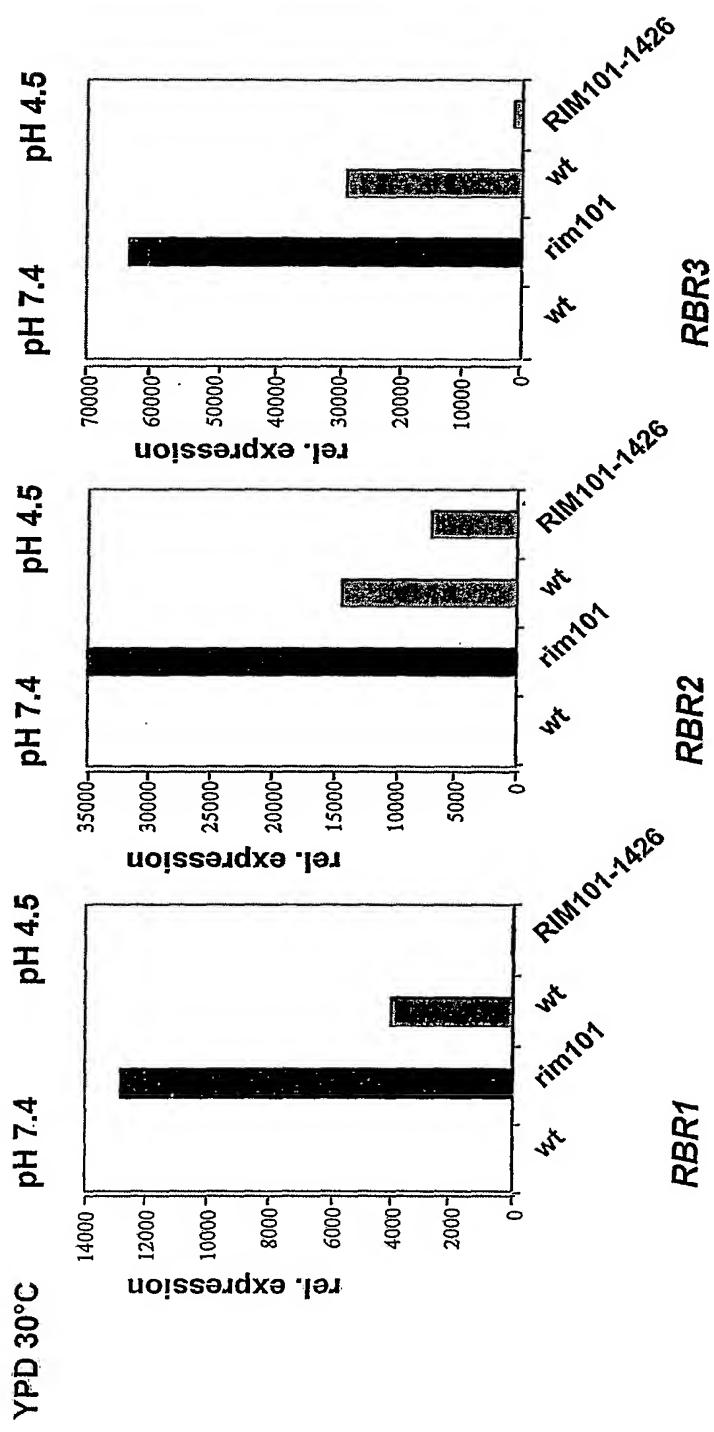


Fig. 1a

Fig. 1b



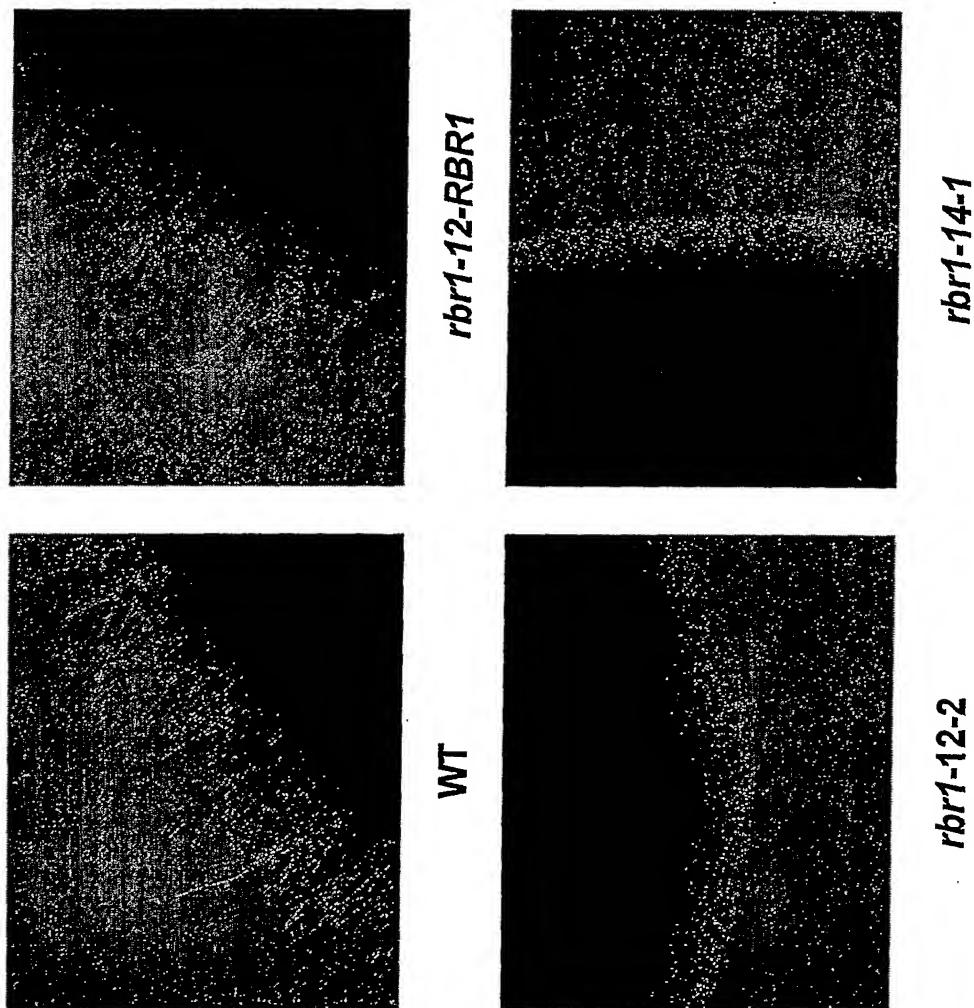


Fig. 2

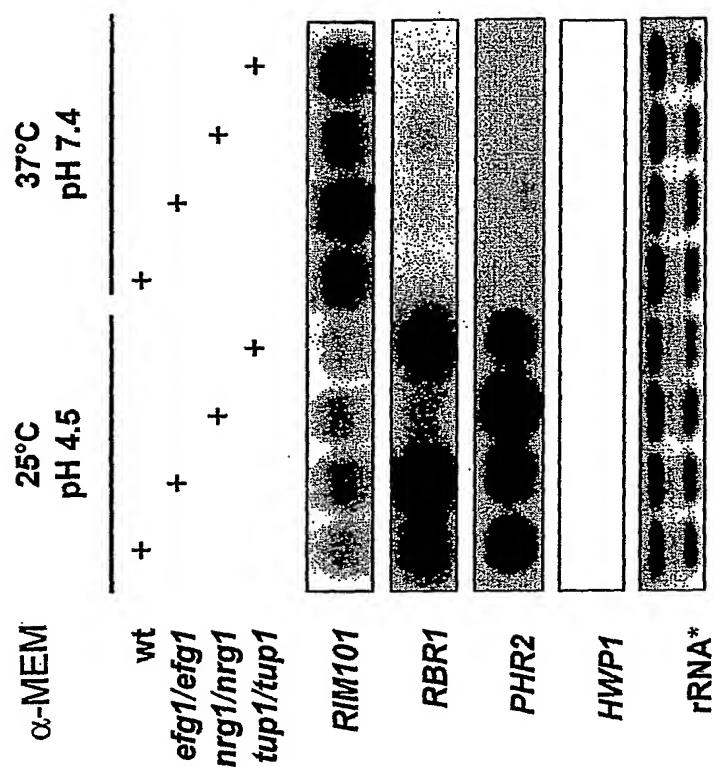
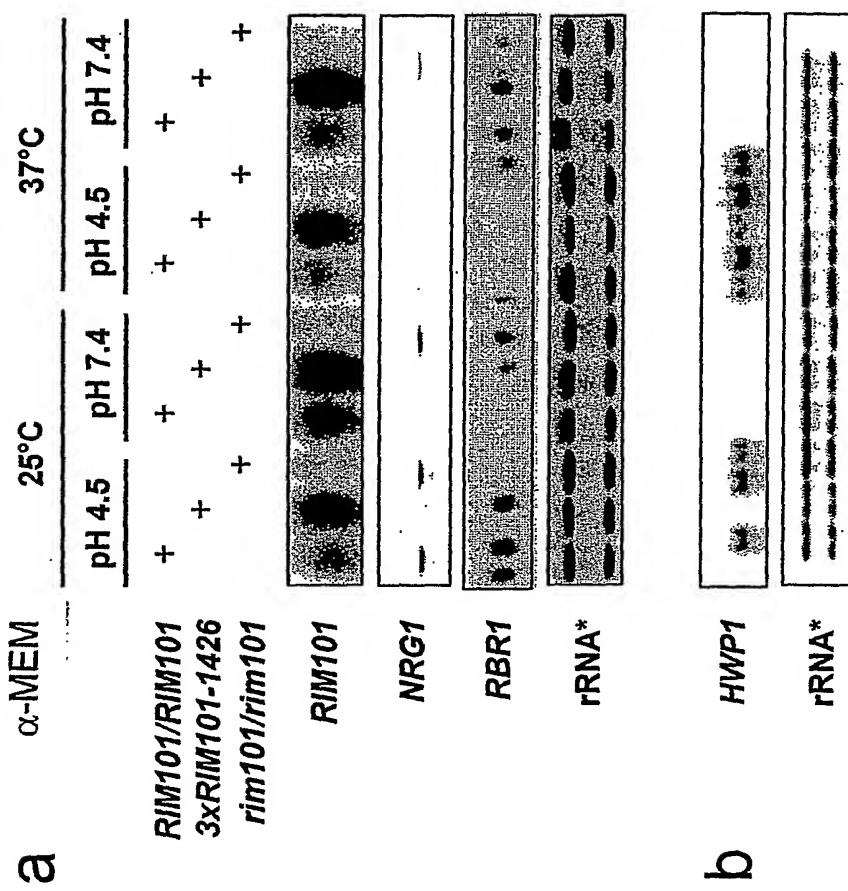


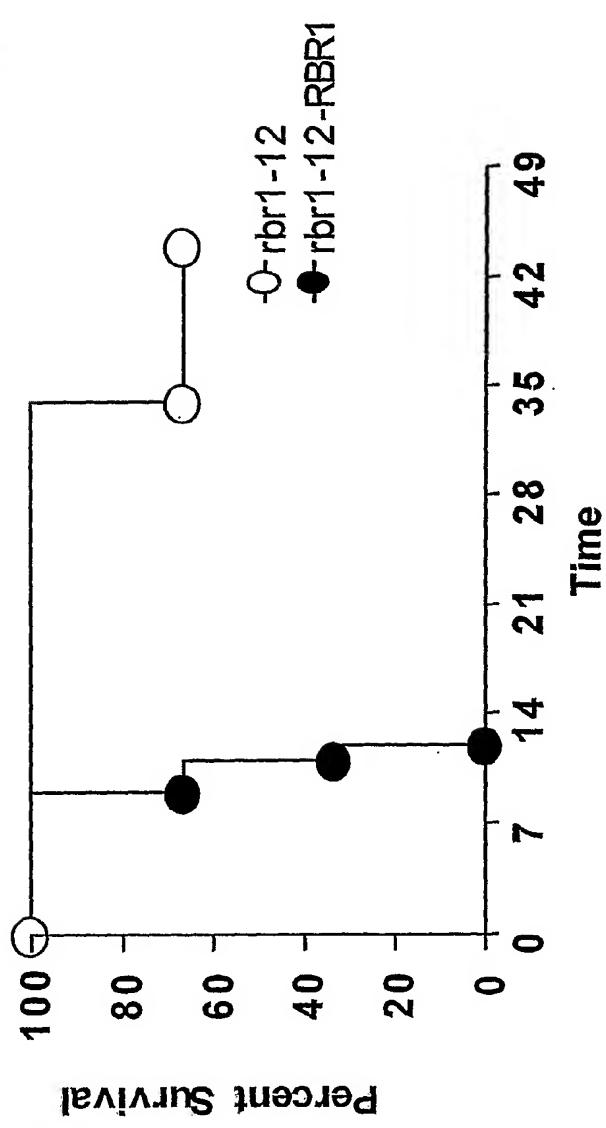
Fig. 3

Fig. 4



Figur 5

5x10e05 Candida Zellen pro Maus



rbr1-12: ura3::imm434/ura3::imm434 rbr1::FRT/rbr1::FRT

rbr1-12-RBR1: ura3::imm434/ura3::imm434 rbr1::FRT/rbr1::FRT rpnl0::RBR1-

SEQUENCE LISTING

<110> Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewand

<120> Hyphenspezifische Zellwandproteine von Candida

<130> 18610

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 1

atgaaaattct ccaccactt attagcttta accgcctcaa ttgctgctgt tatgtctgct 60
gattcatcag ctgctgcctc tggtgctgcc tcggctgctt ctgggtccaa atctgggtgct 120
acctcagctg cttctgggtgc caaatccgggt gcttccttcag ttgcttctgc cgctaaatct 180
ggtgtttctt cagctgcctc agctgctaaa tctggtgctt catctgctac cggtggttca 240
tctgctgcca aatctggctc atcaagtgggt gccgggttttgc ctccctgtcgc tggtgctgggt 300
agcttggcag ccattgctgg tcttttgg tttgtaa 336

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 2

Met Lys Phe Ser Thr Thr Leu Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ile Ala Ala
1 5 10 15

Val Met Ser Ala Asp Ser Ser Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ser Ala
20 25 30

Ala Ser Gly Ala Lys Ser Gly Ala Thr Ser Ala Ala Ser Gly Ala Lys
35 40 45

Ser Gly Ala Ser Ser Val Ala Ser Ala Ala Lys Ser Gly Val Ser Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Ala Ala Lys Ser Gly Ala Ser Ser Ala Thr Gly Gly Ser
65 70 75 80

Ser Ala Ala Lys Ser Gly Ser Ser Gly Ala Gly Phe Ala Pro Val
85 90 95

Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Ala Ile Ala Gly Leu Leu Leu
100 105 110

<210> 3

<211> 507

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 3

atgagattcg	ctttcacaaac	tgtatcatta	tcccttttat	tgtcttcttt	agttgcctca	60
gaagctgcat	catccgatgt	tcaaattcttg	actgccttgg	taggtgatta	tcaagatcat	120
aagaccgatt	atattaaatt	ttttgccacc	gcaaaaagatg	ttccaggta	tttatctacg	180
ttggctacca	aagtgttgac	ttatactgat	gattcataca	caacttggtt	aatgtatgtat	240
tctttgaatg	tttccaactt	agaagcatat	gctacttagtt	tgccatggta	ttccagaatt	300
caagctgatg	ctgggtggcaa	aggttctgcc	tccggttctg	cctctggctc	tggttctgcc	360
aaatcaactg	caagtgtctga	aaaatctagt	ggctcaagt	cttctgccttc	aagcactgca	420
ggtgggttcct	cttctaaagg	tggtgtaagt	gaacttggtt	ccccctgttgg	tgctgttgg	480
ggtgctttgg	cagttgctt	aatgtaa				507

<210> 4

<211> 168

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 4

Met Arg Phe Ala Phe Thr Thr Val Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Ser
1 5 10 15

Leu Val Ala Ser Glu Ala Ala Ser Ser Asp Val Gln Phe Leu Thr Ala
20 25 30

Leu Val Gly Asp Tyr Gln Asp His Lys Thr Asp Tyr Ile Lys Phe Phe
 35 40 45

Ala Thr Ala Lys Asp Val Pro Gly Asp Leu Ser Thr Leu Ala Thr Lys
50 55 60

Val Leu Thr Tyr Thr Asp Asp Ser Tyr Thr Thr Leu Leu Asn Asp Asp
65 70 75 80

Ser Leu Asn Val Ser Asn Leu Glu Ala Tyr Ala Thr Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Tyr Ser Arg Ile Gln Ala Asp Ala Gly Gly Lys Gly Ser Ala Ser Gly
100 105 110

Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Ala Lys Ser Thr Ala Ser Ala Glu Lys
115 120 125

Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Thr Ala Gly Gly Ser Ser
130 135 140

Ser Lys Gly Gly Val Ser Glu Leu Val Ala Pro Val Gly Ala Val Val
145 150 155 160

Gly Ala Leu Ala Val Ala Leu Met
165

<211> 1

<212> DNA

<213> Can

Uro. canadensis

atqataa'

cttcaagtca cattaacttc tttgcttagc acaattcaaa acaatggtat tattgcgttc 300
 aattccctgc cttccttaac atcgccaca tataatttag ttggtttatac ccttgtaac 360
 actggagaaa tgtatTTTC tgcttctggt gtttaccta gtgttatgcc tcttactgct 420
 gcatcttggt caaacagtgg attgatggca ttttatcaaa atcaaagaag ttctggatt 480
 gttagtcttg ggacaccatc aggttcaata accaataatg gtcaaatctg tttgattaac 540
 gaagtctaca aacagaccac aagcatcaac ggttctgggt gtttactgc caatcgtaac 600
 tcgacaatat atattgccaa tgatgttta ccagttcca catcgcaaaa ttttatttg 660
 gcagacagcc aatcttccat aattgttcaa gctattcaa cccctcaagt gtttaatgtc 720
 tatgggtttg gtaacggtaa tatggtcggg gttactcttc cattgatcgg taatatatgg 780
 aatccagcat atagttataa tccatccaca ggtatTTAA gattgagaaa ttttttgtg 840
 tatcaagatt ttaatattgg tcttggttat aatccttagtt tatttctgtat cgttactgac 900
 aatggtgcgtg gtcttccctc aacaataactc ggttccgtt cttatagtgg tcctgttcca 960
 ccaagagctt taccgcacat ttgttaagatt gcatgtaaac ccgtgcctac cgccgcagg 1020
 actaatccaa ccgagtacac gaccacaata acaacaacaatttctgtgg taagccattg 1080
 acagaaaactg gtgtgggtga tattctgact gatagtaacg gatcatgggt ctcaagtact 1140
 acaatcttc caacttcgtc gtcaagttagt agcagtagca gcaactgtttc ttcaactgtc 1200
 ccgtcatctt caagcaccaa accttcatcc agtagccaaac catcttctac tccaccacca 1260
 tcttcaagttt gtaaagcatac atcaactact ccaagctcta gtagtcaatc gtcttcaact 1320
 actccaagctt caagcagtaa gccttctca actgtaccac caactggcag cagtcagtca 1380
 tcttcaacta tcccaagttc cagtaactcaa ccttcttcta ctgctccatc atctttaagt 1440
 tctccatctt cttctactac tccaagctcc agcagtaat cttcatTTT tgctcaaagc 1500
 tcttattggcc agacatcgtc ttctactgtt tcttgcgtga gtagtcaacc atcgtgctgg 1560
 gagtcatcaa gcagtcagtc gtcatccggt acgacaagtt ccagtagtca gtttttttca 1620
 agtgcacac cgtcaagtac acaatctcty tttactgctg aaagctccaa tagtcaatta 1680
 tc 1682

<210> 6

<211> 560

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 6

Met	Ile	Ile	Phe	Arg	Lys	Ser	Phe	Phe	Thr	Phe	Trp	Leu	Leu	Leu	Asn
1															15

Ser	Val	Leu	Ala	Leu	Val	Ile	Thr	Gln	Asn	Arg	Val	Asp	Arg	Gly	Val
															30
20															

Leu	Asp	Val	Ser	Val	Gly	Asn	Ile	Thr	Ile	Asn	Ser	Gly	Ala	Ser	Trp
															45
35															

Ser	Ile	Ile	Asn	Asn	Ala	Ile	Ser	Thr	Leu	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Val
															60
50															

Gln	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Tyr	Ile	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Ser
															80
65															

Leu	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Thr	Ile	Gln	Asn	Asn	Gly
															95
85															

Ile	Ile	Ala	Phe	Asn	Ser	Ser	Pro	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asn
															110
100															

Leu	Val	Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Asn	Thr	Gly	Glu	Met	Tyr	Phe	Ser	Ala
															125
115															

Ser	Gly	Val	Leu	Pro	Ser	Val	Met	Ala	Leu	Thr	Ala	Ala	Ser	Trp	Ser
															140
130															

Asn	Ser	Gly	Leu	Met	Ala	Phe	Tyr	Gln	Asn	Gln	Arg	Ser	Ser	Gly	Ile
															160
145															

Val Ser Leu Gly Thr Pro Ser Gly Ser Ile Thr Asn Asn Gly Gln Ile
 165 170 175

 Cys Leu Ile Asn Glu Val Tyr Lys Gln Thr Thr Ser Ile Asn Gly Ser
 180 185 190

 Gly Cys Phe Thr Ala Asn Arg Asn Ser Thr Ile Tyr Ile Ala Asn Val
 195 200 205

 Leu Leu Pro Val Ser Thr Ser Gln Asn Phe Tyr Leu Ala Asp Ser Gln
 210 215 220

 Ser Ser Ile Ile Val Gln Ala Ile Ser Thr Pro Gln Val Phe Asn Val
 225 230 235 240

 Tyr Gly Phe Gly Asn Gly Asn Met Val Gly Val Thr Leu Pro Leu Ile
 245 250 255

 Gly Asn Ile Trp Asn Pro Ala Tyr Ser Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Ile
 260 265 270

 Leu Arg Leu Arg Asn Phe Phe Val Tyr Gln Asp Phe Asn Ile Gly Pro
 275 280 285

 Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Phe Ser Ile Val Thr Asp Asn Gly Ala Gly
 290 295 300

 Leu Pro Ser Thr Ile Leu Gly Ser Val Ser Tyr Ser Gly Pro Val Pro
 305 310 315 320

 Pro Arg Ala Leu Pro Ala Ser Cys Lys Ile Ala Cys Lys Pro Val Pro
 325 330 335

 Thr Ala Pro Gly Thr Asn Pro Thr Glu Tyr Thr Thr Thr Ile Thr Thr
 340 345 350

 Thr Asn Ser Ala Gly Lys Pro Leu Thr Glu Thr Gly Val Val Asp Ile
 355 360 365

 Ser Thr Asp Ser Asn Gly Ser Trp Phe Ser Ser Thr Thr Ile Phe Pro
 370 375 380

 Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Val Ser Ser Thr Ala
 385 390 395 400

 Pro Ser Ser Ser Ser Thr Lys Pro Ser Ser Ser Ser Gln Pro Ser Ser
 405 410 415

 Thr Pro Pro Pro Ser Ser Ser Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr Pro Ser
 420 425 430

 Ser Ser Ser Gln Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ser Ser Ser Ser Lys Pro
 435 440 445

 Ser Ser Thr Val Pro Pro Thr Gly Ser Ser Gln Ser Ser Ser Thr Ile
 450 455 460

 Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser Leu Ser
 465 470 475 480

 Ser Pro Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ser Ser Ser Ser Gln Ser Ser Phe
 485 490 495

Ser Ala Gln Ser Ser Ile Gly Gln Thr Ser Ser Ser Thr Val Ser Ser
500 505 510

Ser Ser Ser Gln Pro Ser Cys Trp Glu Ser Ser Ser Gln Ser Ser
515 520 525

Ser Gly Thr Thr Ser Ser Ser Gln Phe Ser Ser Ser Ala Pro Pro
530 535 540

Ser Ser Thr Gln Ser Ser Phe Thr Ala Glu Ser Ser Asn Ser Gln Leu
545 550 555 560

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002748

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	US 6 747 137 B1 (WEINSTOCK KEITH G ET AL) 8 June 2004 (2004-06-08) sequence 22616 column 2; sequence 8513 sequence 13405 sequence 170 sequence 14273 column 6, paragraph 1 column 8, paragraph 7 column 9, paragraph 1 – paragraph 3 column 10, paragraph 3 "EXEMPLIFICATION" ----- -/-/	1-17,28, 29

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2005

Date of mailing of the international search report

30/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL – 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Y

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002748

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOHN K., ET AL: "EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in Candida Albicans as revealed by DNA microarrays" MOLECULAR MICRONIOLOGY, vol. 47, no. 1, 2003, pages 89-102, XP002331978 cited in the application the whole document -----	1-29, 31-67
T	KONDORI N ET AL: "CANDIDA ALBICANS CELL WALL ANTIGENS FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF CANDIDEMIA" MEDICAL MYCOLOGY, OXFORD, GB, vol. 41, no. 1, February 2003 (2003-02), pages 21-30, XP008025341 ISSN: 1369-3786 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **30**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see supplemental sheet

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of II.2

Claim: 30

The current claim 30 relates to a product defined by a desirable characteristic or property, namely an antibody-specific antibody, homologous proteins, substances that inhibit the activity of a claimed protein, or were identified with method indicated in claim 50.

The claims therefore encompass all products, etc., that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product or method in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
EP2005/002748

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 2, 5, 21 and 22; plus 1, 6-20, 27-29 and 31-67 (in part)

cell wall protein of C. albicans (Seq. Id. No. 1 and Seq. Id. No.2) and cells, vectors ,methods, etc., derived therefrom.

2. Claims 3, 23 and 24; plus 1, 6-20, 27-29 and 31-67 (in part)

cell wall protein of C. albicans (Seq. Id. No. 3 and Seq. Id. No. 4) and cells, vectors ,methods, etc., derived therefrom.

3. Claims 4, 25 and 26; plus 1, 6-20, 27-29 and 31-67 (in part)

cell wall protein of C. albicans (Seq. Id. No. 5 and Seq. Id. No. 6) and cells, vectors ,methods, etc., derived therefrom.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/002748

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6747137	B1 08-06-2004	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002748

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	US 6 747 137 B1 (WEINSTOCK KEITH G ET AL) 8. Juni 2004 (2004-06-08) Sequenz 22616 Spalte 2; Sequenz 8513 Sequenz 13405 Sequenz 170 Sequenz 14273 Spalte 6, Absatz 1 Spalte 8, Absatz 7 Spalte 9, Absatz 1 – Absatz 3 Spalte 10, Absatz 3 "EXEMPLIFICATION" ----- -/-/	1-17,28, 29

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
21. Juni 2005	30/06/2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Keller, Y

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002748

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SOHN K., ET AL: "EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in Candida Albicans as revealed by DNA microarrays" MOLECULAR MICRONIOLOGY, Bd. 47, Nr. 1, 2003, Seiten 89-102, XP002331978 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-29, 31-67
T	KONDORI N ET AL: "CANDIDA ALBICANS CELL WALL ANTIGENS FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF CANDIDEMIA" MEDICAL MYCOLOGY, OXFORD, GB, Bd. 41, Nr. 1, Februar 2003 (2003-02), Seiten 21-30, XP008025341 ISSN: 1369-3786 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002748**Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr. 30 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210

3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Fortsetzung von Feld II.2	
Ansprüche Nr.: 30	
<p>Die geltenden Patentansprüche 30 beziehen sich auf ein Produkt, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich ein Antikörper spezifischer Antikörper, homologe Proteine, Subsanzen die eine Aktivität eines beanspruchten Proteins hemmen, oder mit dem Verfahren des Anspuches 50 identifiziert wurden. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Artikels 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Masse, dass eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Artikels 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt/Verfahren über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, dass er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen.</p> <p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.</p>	

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 2, 5, 21, 22 and 1, 6-20, 27-29, 31-67 (teilweise)

Zellwandproteine von C.albicans (SEQ ID. No 1 und SEQ ID. No 2) und davon abgeleitete Zellen, Vektoren, Verfahren etc...

2. Ansprüche: 3, 23, 24 and 1, 6-20, 27-29, 31-67 (teilweise)

Zellwandproteine von C.albicans (SEQ ID. No 3 und SEQ ID. No 4) und davon abgeleitete Zellen, Vektoren, Verfahren etc...

3. Ansprüche: 4, 25, 26 and 1, 6-20, 27-29, 31-69 (teilweise)

Zellwandproteine von C.albicans (SEQ ID. No 5 und SEQ ID. No 6) und davon abgeleitete Zellen, Vektoren, Verfahren etc...

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002748

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6747137	B1 08-06-2004	KEINE	